

**Differenzierungsmuster und Stoffwechselleistungen
von Gelenkchondrozyten bei der humanen
Osteoarthrose**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Steffi Neumann
geboren am 18. März 1982
in Weimar

Jena, 2009

Liste der Gutachter:

1. Prof. Rolf Bräuer (Jena)
2. Dr. habil. Jürgen Mollenhauer (Jena, Tübingen)
3. Prof. Rolf Brenner (Ulm)

Tag der öffentlichen Disputation: 12. März 2009

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
III Abkürzungsverzeichnis	VII
IV Zusammenfassung	X

1 Einleitung

1.1 Der hyaline Gelenkknorpel	1
<i>1.1.1 Eigenschaften und Struktur</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Bestandteile</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2.1 Chondrozyten</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2.2 Extrazelluläre Matrix</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3 Besonderheiten der Nährstoffversorgung</i>	<i>5</i>
1.2 Die degenerative Gelenkerkrankung Osteoarthritis	6
<i>1.2.1 Pathomechanismen der Osteoarthritis</i>	<i>7</i>
1.3 Tissue Engineering	8
<i>1.3.1 Chondrozytenisolation</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2 Kultivierung von Chondrozyten</i>	<i>12</i>
1.4 Signalweiterleitung	14
1.5 Regulation transkriptionaler Aktivität - Histondeacetylasen	16
1.6 Problemstellung und Ziel der Arbeit	20

2 Material und Methoden

2.1 Material	22
<i>2.1.1 Gelenkknorpel</i>	<i>22</i>
<i>2.1.2 Primer</i>	<i>22</i>
<i>2.1.3 Chemikalien</i>	<i>24</i>
<i>2.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme und gebrauchsfertige Produkte</i>	<i>26</i>
<i>2.1.5 Antikörper</i>	<i>26</i>
<i>2.1.6 Reagenzien</i>	<i>28</i>
2.2 Methoden	30
<i>2.2.1 Zellbiologische Methoden</i>	<i>30</i>

2.2.1.1 Knorpelpräparation und Chondrozytenisolation	30
2.2.1.2 2D-Kultivierung von Chondrozyten	32
2.2.1.3 3D-Kultivierung von Chondrozyten	33
2.2.1.4 Behandlung des Humanserums	34
2.2.1.5 Charakterisierung der Seren	34
2.2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	34
2.2.2.1 RNA-Isolation	34
2.2.2.2 Qualitätsprüfung der RNA	36
2.2.2.3 Reverse Transkription	36
2.2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
2.2.2.5 Gelelektrophorese	37
2.2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR	37
2.2.2.7 Affymetrix-Chip-Analyse	39
2.2.2.8 HDAC-Profilerstellung	39
2.2.3 <i>Biochemische Methoden</i>	39
2.2.3.1 Bestimmung der AP-Aktivität	39
2.2.3.2 Bestimmung des Proteoglykangehaltes (DMB/DNA-Assay)	40
2.2.3.3 HDAC-Aktivitätsassay	40
2.2.3.4 Zelllysis zur Proteinbestimmung	40
2.2.3.5 Gelelektrophorese eines Proteingels	40
2.2.3.6 Western Blot	41
2.2.4 <i>Histologische Methoden</i>	42
2.2.4.1 FDA (Fluorescein Diacetat)/PI (Propidiumiodid)-Färbung	42
2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung	43
2.2.5 <i>Auswertung</i>	43
2.2.5.1 Statistik	43
2.2.5.2 Signalwege der Affymetrix-Chip-Analyse	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Einfluss von FKS und HuS auf Chondrozytenisolation und -expansion	45
3.1.1 <i>Chondrozytenisolation</i>	45
3.1.2 <i>Chondrozytenexpansion</i>	48

3.2 Einfluss eines Minimalmediums auf die Chondrozytenisolation und anschließende Kultivierung	50
3.2.1 <i>Chondrozytenisolation, 2D- und 3D-Kultivierung</i>	50
3.2.2 <i>2D-Kultivierung nach 5 d</i>	56
3.3 HDAC-Profil im Knorpelgewebe	70
 4 Diskussion	 75
4.1 Probenmaterial	75
4.2 Isolationsmedien	76
4.3 Chondrozytenisolation und -expansion unter Zusatz von FKS oder HuS	77
4.4 Einfluss der Isolationsmedien auf die Chondrozytenisolation und anschließende Kulturen	79
4.4.1 <i>Regulationsuntersuchungen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung</i>	83
4.5 HDAC-Profil im Knorpelgewebe	92
4.6 RNA-Qualität	95
4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick	96
 5 Literaturverzeichnis	 97
 6 Danksagung	 106
 7 Erklärungen	 107
7.1 Selbstständigkeitserklärung	107
7.2 Erklärung zur Dissertation	107
 8 Lebenslauf	 108

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen - Einleitung

Abb. 1: Intraoperativer Situs vor Implantation einer Knie-Totalendoprothese	7
Abb. 2: Matrix-gekoppelte ACT	10
Abb. 3: Vereinfachte Übersicht der drei MAPK-Hauptwege der Mammalia	15
Abb. 4: Schematische Darstellung der Chromatin-Regulation durch HATs und HDACs	17
Abb. 5: Zink-abhängige HDACs und deren Domänenstrukturen	18

Abbildungen - Material und Methoden

Abb. 6: Übersicht der Chondrozytenisolationen und anschließenden Kulturen	32
---	----

Abbildungen - Ergebnisse

Abb. 7: Reduktion der mRNA-Expression durch Chondrozytenisolation in MINI unter Zusatz von FKS oder HuS	46
Abb. 8: Morphologie der humanen Chondrozyten nach 14-tägiger 2D-Kultur in DMEM unter Zusatz von 5% HuS oder 5% FKS	48
Abb. 9: Humane Chondrozyten nach Isolation in DMEM oder MINI sowie anschließender 2D-Kultur	51
Abb. 10: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf das Kollagen Typ II/I-Verhältnis humaner Chondrozyten nach Isolation und Kultivierung	53
Abb. 11: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf die AP-Aktivität humaner Chondrozyten nach Isolation und Kultivierung	55
Abb. 12: Vergleich der Proteoglykan-Expressionen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung der in MINI oder DMEM isolierten, humanen Chondrozyten	58
Abb. 13: Vergleich der MMP-Expressionen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung der in MINI oder DMEM isolierten, humanen Chondrozyten	59
Abb. 14: Vergleich der Genexpression nach 5-tägiger 2D-Kultivierung der in MINI oder DMEM isolierten, humanen Chondrozyten	60
Abb. 15: Proteinnachweis der Kollagen Typen I und II von in DMEM oder MINI isolierten, humaner Chondrozyten nach 5-tägiger 2D-Kultur	61
Abb. 16: Proteinnachweis mittels Western Blot von ERK, p38 und JNK	63

Abb. 17: Erhöhung der HDAC-Expression nach Isolation humaner Chondrozyten in MINI und anschließender 2D-Kultivierung	64
Abb. 18: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf die HDAC-Expression nach 5-tägiger 2D-Kultivierung in DMEM	65
Abb. 19: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf die Kopienzahl der HDAC2- und -6-Expressionen nach 5-tägiger 2D-Kultur in DMEM	66
Abb. 20: Proteinnachweis der HDACs	67
Abb. 21: Fluorimetrische Bestimmung der HDAC-Aktivität	69
Abb. 22: Charakterisierung der mRNA-Expressionen der HDAC in normalen Knorpelgeweben	71
Abb. 23: Charakterisierung der mRNA-Expressionen der HDAC in osteoarthrotischen Knorpelgeweben	72
Abb. 24: Charakterisierung der signifikanten Unterschiede in der HDAC-Expression zwischen Normal- und osteoarthrotischen Knorpelgeweben	73
Abb. 25: Untersuchung der mRNA-Expression von GAPDH und HDAC4 in Normal- und osteoarthrotischen Knorpelgeweben mittels PCR	73
Abb. 26: Untersuchung der mRNA-Expression von HDAC7A und HDAC10 in Normal- und osteoarthrotischem Knorpelgewebe mittels PCR	74

Tabellen - Material und Methoden

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Primer	22
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien	23
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Testsysteme	25
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper	26
Tab. 5: Reaktionsansatz für die PCR	36
Tab. 6: PCR-Protokoll	37
Tab. 7: Reaktionsansatz für die qRT-PCR	38
Tab. 8: qRT-PCR-Protokoll	38
Tab. 9: Ansatz zur Reduktion der Proben	41

Tabellen - Ergebnisse

Tab. 10: Einfluss von HuS und FKS auf die Zellausbeute nach Isolation humaner Chondrozyten	45
--	----

Tab. 11: Bestimmung der Serumkonzentrationen des HuS und FKS Glucose, Insulin, Insulin-Like Growth Factor-1, Parathormon und Östradiol	47
Tab. 12: Einfluss von HuS und FKS auf die Proliferationsrate und den Proteoglykangehalt (GAG/DNA)	48
Tab. 13: Übersicht der Genexpression humaner Chondrozyten nach 14-tägiger 2D-Kultur in DMEM unter Zusatz von 5% HuS oder 5% FKS	49
Tab. 14: Einfluss der Isolationsmedien DMEM oder MINI auf die Zellausbeute humaner Chondrozyten	50
Tab. 15: Übersicht der Genexpression humaner Chondrozyten	52
Tab. 16: Übersicht des Proteoglykangehaltes (GAG/DNA)	54
Tab. 17: Übersicht der Kollagen-Expressionen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung der in MINI oder DMEM isolierten, humanen Chondrozyten	57
Tab. 18: Übersicht der, der MAPK-Kaskade zugehörigen Genexpression nach 5-tägiger 2D-Kultivierung	62

III Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cystein
ca.	circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
°C	Grad Celsius
d	Tage
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DMEM-Iso	Zellen nach Isolation in DMEM
DMEM-2D	in DMEM isolierte Zellen nach 2D-Kultur in DMEM
DMEM-3D	in DMEM isolierte Zellen nach 3D-Kultur in DMEM
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetra-acetic acid
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
FDA	Fluorescein Diazetat
g	Gramm; Geschwindigkeit
G	Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HAT(s)	Histonacetyltransferase(n)

HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HuS	Humanserum
kDa	Kilo-Dalton
Kol	Kollagen Typ
Kol II/I	Kollagen Typ II zu I-Verhältnis
M	Marker
M	Molar
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
MMP(s)	Matrixmetalloproteinase(n)
min	Minute
MINI	Minimalmedium
MINI-Iso	Zellen nach Isolation in MINI
MINI-2D	in MINI isolierte Zellen nach 2D-Kultur in DMEM
MINI-3D	in MINI isolierte Zellen nach 3D-Kultur in DMEM
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
μ U	Mikrounits
N	Normal(knorpel)
NaCl	Natriumchlorid
NK	natives Knorpelgewebe
OA	Osteoarthrose, osteoarthrotisch
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
phospho	phosphoryliert
PI	Propidiumiodid
pg	Picogramm
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
%	Prozent
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RFU	relative Fluoreszens-Units
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TIMP	MMP-Inhibitor (Tissue Inhibitors of MMPs)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
∞	unendlich

IV Zusammenfassung

Auf Grund des eingeschränkten Regenerationspotenzials des Gelenkknorpels stellt die Behandlung chondraler Defekte eine große Herausforderung dar. Die Entwicklung von Techniken im Bereich der Geweberegeneration soll der Füllung größerer Knorpeldefekte dienen sowie eine Möglichkeit zur Behandlung degenerativer Knorpelschäden bieten.

Während der Isolierung und Kultivierung autologer Chondrozyten findet eine massive Veränderung des Phänotyps statt. Diese Dedifferenzierung geht mit einer Expression untypischer Knorpelproteine, wie beispielsweise Kollagen Typ I, einher.

Während die Veränderungen im Zellverhalten in der Chondrozytenkultur vergleichsweise gut untersucht sind, wurden die Auswirkungen der Isolationsbedingungen auf den Phänotyp der Chondrozyten bislang nur wenig beachtet.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, durch Reduktion von Nährstoffen während der Isolation, die Dedifferenzierung der Chondrozyten zu reduzieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich Veränderungen in den Isolationsbedingungen auch auf die nachfolgende 2D- oder 3D-Kultivierung auswirken.

Durch die Untersuchung verschiedener Parameter (Zellausbeute, Zellmorphologie, Genexpressionsmuster, Aktivität der Alkalischen Phosphatase, Proteoglykangehalt, Proteinexpression) konnte der Einfluss einer nährstoffarmen Chondrozytenisolation auf die Dedifferenzierung der Chondrozyten betrachtet und mit der Standardisolation in DMEM verglichen werden.

Direkt nach Isolation erzielte die nährstoffarme Chondrozytenisolation eine Reduktion des Stoffwechsels. Zur Betrachtung der Dedifferenzierung wurde das Kollagen Typ II/I-Verhältnis ermittelt. Durch die nährstoffarme Isolation und anschließende 2D-Kultivierung konnte ein signifikant erhöhtes Kollagen Typ II/I-Verhältnis und somit eine geringere Dedifferenzierung der Chondrozyten nachgewiesen werden. Zudem konnte durch diese Isolationsbedingung die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, als Marker für Mineralisierung, reduziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Chondrozytenisolation einen bedeutenden Einfluss auf die Dedifferenzierung kultivierter Chondrozyten ausübt. Eine Anpassung an die nährstoffarme *in vivo*-Situation der Chondrozyten, durch den Einsatz eines Minimalmediums als Isolationsmedium, stabilisierte nach der 2D-Kultivierung den chondrozytären Phänotyp. Der Einsatz dieses Isolationsmediums stellt einen neuen und

vorteilhaften Ansatz bei der Behandlung von Knorpeldefekten durch die autologe Chondrozytentransplantation dar.

1 Einleitung

1.1 Der hyaline Gelenkknorpel

1.1.1 Eigenschaften und Struktur

Gesunder artikulärer Knorpel ist hochbelastbar sowie stoßdämpfend-elastisch und kann somit den hohen Anforderungen in den Gewicht tragenden Gelenken gerecht werden. Durch seine einzigartige Architektur ermöglicht er eine hervorragende Anpassung an die im Gelenk auftretenden Kräfte. Das Knorpelgewebe ist avaskulär und nicht innerviert. Es weist vier horizontale Zonen auf. Dabei werden eine Tangentialzone, eine Übergangs-, eine Radiär- und eine kalzifizierte Zone unterschieden. Die einzelnen Zonen unterscheiden sich in der Matrixzusammensetzung und in der Morphologie der Chondrozyten, den Zellen des Knorpels [1].

Die Tangentialzone grenzt den Knorpel von umgebenden Geweben, Flüssigkeiten und darin enthaltenen Zellen ab [2]. Sie besteht aus ein bis drei parallelen Schichten spindelförmiger Chondrozyten, welche weniger als 10% der Gesamtzellzahl des Knorpelgewebes ausmachen. Diese Chondrozyten unterscheiden sich stark von den tiefer liegenden Chondrozyten. Sie produzieren eine spezifische extrazelluläre Matrix mit einem hohen Kollagen- und Fibronektinanteil [3]. Durch tangential verlaufende Kollagenfasern können Belastungen gleichmäßig über die gesamte Knorpeloberfläche verteilt werden [4].

Die Übergangszone ist durch eine veränderte Verlaufsrichtung der Fasern und eine sphärische Form der Chondrozyten gekennzeichnet. Die Zellen sind von einer "perizellulären" und einer sich daran anschließenden "territorialen" Matrix umgeben. Die Übergangszone ist durch eine hohe Synthese von Proteoglykanen, als Bestandteil der extrazellulären Matrix, gekennzeichnet.

In der Radiärzone sind die runden, ellipsoiden Chondrozyten senkrecht zur Knorpeloberfläche in Säulen von 2-6 Zellen angeordnet. Die Zellen der Übergangs- und Radiärzone sind in der Lage nahezu alle extrazellulären Bestandteile des Knorpels wie Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine, Hyaluronsäure und katabole Enzyme wie beispielsweise Metalloproteinasen zu produzieren [5, 6].

Die kalzifizierte Zone oder auch Mineralisierungszone genannte Schicht, verbindet den Knorpel mit subchondralem Knochen. Die Chondrozyten dieser Schicht sind kleiner, rund und durch eine geringe Stoffwechselaktivität gekennzeichnet [7]. Die Trennung

unkalzifizierter und kalzifizierter Bereiche wird durch die "Tidemark", eine ca. 10 µm dicke, zellfreie Linie, sichtbar [5].

1.1.2 Bestandteile

Der hyaline Gelenkknorpel besteht aus den Chondrozyten und einer, diese Zellen umgebenden, extrazellulären Matrix.

1.1.2.1 Chondrozyten

Chondrozyten sind strukturell und funktionell differenzierte Mesenchymzellen. Im adulten Knorpelgewebe sind sie die einzige Zellart und bilden einen Anteil von 2-5% des gesamten Gewebevolumens [8]. Im gesunden adulten Knorpelgewebe findet keine Proliferation dieser Zellen mehr statt. Chondrozyten leben in einem weitgehend anaeroben Milieu und weisen eine geringe Stoffwechselrate auf [9]. Sie sind in die EZM eingebettet und für die Bildung und Aufrechterhaltung dieser verantwortlich. Die Chondrozyten können als Einzelzellen oder zusammengelagert in so genannten Chondronen vorkommen. Chondrone werden als eine Untereinheit in der Knorpelmatrix angesehen, welche keine Zellkontakte zu den benachbarten Zellen zulässt. Die Kommunikation zwischen den Chondrozyten und auch die Nährstoffversorgung sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten erfolgt über die EZM. Im Rahmen der Zell-Matrix-Interaktion wurden Integrine, eine Familie von Signaltransduktions-Proteinen, auf der Zelloberfläche von Chondrozyten beschrieben. Zudem scheinen beschriebene Hyaluronsäurerezeptoren von Chondrozyten eine bedeutsame Rolle beim Aufbau und Stoffwechsel der Knorpelmatrix zu übernehmen [5].

1.1.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) sind Wasser, Kollagenfibrillen, Proteoglykane, Glykoproteine und Ionen. Durch das Zusammenwirken dieser Bestandteile gewinnt das hyaline Knorpelgewebe an Form, Stabilität, Zugfestigkeit und Viskoelastizität [10].

Die EZM besteht zu etwa 50% aus Kollagen, wobei verschiedene Typen wie Kollagen Typ (Kol) II, -VI, -IX, -X und -XI bekannt sind.

Kollagenmoleküle sind aus drei helikalen α -Polypeptidketten aufgebaut, welche seilartig zu einer Tripelhelix gewunden sind. Die einzelnen Helices sind über Quervernetzungen der Lysin- und/oder Hydroxylysinseitenketten miteinander

verbunden. Die Domänen der Polypeptidketten bestehen aus repetitiven Gly-X-Y-Aminosäuresequenzen. Dabei werden die X und Y Positionen häufig durch Prolin und Hydroxyprolin besetzt. Da Glycin die kleinste Aminosäure, mit nur einem Wasserstoff als Seitenkette darstellt, wird eine dichte Aneinanderlagerung der Polypeptidketten begünstigt. Zudem ermöglichen die häufig vorkommenden Prolin- und Hydroxyprolinreste aufgrund ihrer Pyrrolidinringe nur eine geringe Drehung der Peptidketten, wodurch die Stabilität der Tripelhelix gestärkt wird.

Nach der intrazellulären Synthese der Prokollagene werden die amino (N)- und carboxy (C)-terminalen Propeptide extrazellulär abgespalten, wodurch die Umwandlung zu funktionellen Kollagenmolekülen bzw. die Bildung von Kollagenfibrillen erfolgt [11].

Die extrazellulären Fasern im hyalinen Knorpel sind dem Kol II zuzuordnen, welches im Knorpelgewebe über 90% des Gesamtkollagenanteils repräsentiert und aus drei identischen $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten besteht [12]. Die fein fibrillären Fasern des Kol II bilden eine arkadenförmige Struktur und garantieren dadurch Druckfestigkeit und Elastizität. Die Kol II-Moleküle sind über das Protein Anchorin C II (Annexin V) an der Oberfläche der Chondrozyten verankert, welche eine Interaktion zwischen Matrix und Zellen ermöglicht [13].

Kol VI bildet im Bereich der Chondrone ein dreidimensionales Netzwerk und scheint deren Zusammenhalt sowie Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung zu begünstigen [14].

Kol IX und -XI liegen mit Kol II vernetzt vor und dienen der Stabilisierung des Netzwerkes [15].

Kol X ist ausschließlich in der Mineralisierungszone zu finden und stellt einen Marker für Hypertrophie dar. Es scheint funktionell mit dem Kalzifizierungsprozess in fetalem Knorpel in der Wachstumsfuge in Verbindung zu stehen. Ähnlich dem Kol VI bildet Kol X ein Netzwerk und keine Fibrillen aus. In adultem, artikulären Knorpel weist eine zunehmende Kol X-Synthese auf Hypertrophie der Chondrozyten im Verlauf einer Arthrose hin [5, 16, 17].

Das Kol I nimmt eine besondere Stellung ein, da es normalerweise nicht im gesunden, hyalinen Knorpel vorkommt. Es stellt einen Marker für die Dedifferenzierung von Chondrozyten dar, welche in Zellkultur und auch in der Osteoarthrose eine Rolle spielt [18].

Um die chondrogene Stoffwechselaktivität bzw. den Dedifferenzierungsstatus von Zellkulturen zu bewerten, wird meist das Verhältnis der Kol II- zu Kol I-Expression (Kol II/I) untersucht.

Die EZM besteht zu etwa 30% aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (GAG). Das strukturell einfachste GAG ist Hyaluronsäure (Hyaluronan). Sie besteht aus sulfatfreien Disaccharidketten und trägt funktionell zum Aufbau der EZM bei. Zudem ist sie ein wichtiger Bestandteil der Synovia (Gelenkflüssigkeit). Hyaluronsäure ist ein globulär vorliegendes Polymer, welches unter plötzlichem Druck zu einer hohen Viskosität der Synovia beiträgt. Treten jedoch Scherkräfte auf, bilden sich lineare Filamente, wodurch die Gelenkflächen longitudinal sanft aufeinander gleiten können. Hyaluronsäure ausgenommen, liegen alle GAGs, kovalent mit Proteinen gebunden, als Proteoglykane vor. An das Core-Protein können dabei bis zu einige Hundert verschiedene GAG-Ketten gebunden sein [19].

Das quantitativ bedeutendste Proteoglykan des Knorpels ist Aggrekan, welches in Form von Proteoglykan-Aggregaten vorkommt. Das Kernprotein von Aggrekan besteht aus drei globulären Domänen (G1,G2,G3) und zwei interglobulären Domänen (E1,E2) [20]. Durch Bindung von GAGs in der E2-Region und Bindung von Hyaluronsäureketten an der N-terminalen G1-Domäne können sich die im Gewebe vorkommenden Proteoglykan-Aggregate bilden [21]. Die anionische Struktur und die hohe Wasserbindungsfähigkeit von Aggrekan charakterisieren die osmotischen Eigenschaften des Knorpels. Da diese Aggrekanmoleküle fest in das straffe Kollagenfasernetz eingebunden sind, entsteht ein enormer osmotischer Druck, der für die prallelastische Eigenschaft des Knorpels verantwortlich ist [10].

Ein weiteres Proteoglykan ist das im Knorpel beschriebene Glypikan 3 [22], welches zur Familie der Heparansulfat-Proteoglykane gehört. Diese sind über ein Glycosylphosphatidylinositol an die Zelloberfläche gebunden [23]. Glypikan 3 wird überwiegend während der Entwicklung exprimiert, während dessen Expression in adultem Gewebe streng limitiert ist. Glypikan 3 ist ein äußerst vielseitiges Proteoglykan, welches in die Regulation von Wachstumsfaktoren und abhängig vom Gewebe in die Regulation der Morphogenese involviert ist [24-26].

Perlekan stellt ein weiteres Heparansulfat-Proteoglykan dar und besitzt eine einzelne Heparansulfat-Bindungsregion am N-Terminus.

Heparansulfat-Proteoglykane übernehmen Funktionen in der Zelladhäsion und Bindung von Wachstumsfaktoren [27].

Syndekan gehört zu den integralen Membran-Proteoglykanen, welches sowohl Heparansulfat- als auch Chondroitinsulfat-Ketten trägt und direkt an die Zelloberfläche gebunden ist [28]. Durch Bindungen von beispielsweise Kol Typ I, -III, -V und Fibronectin ist es an der Stabilisierung der EZM beteiligt [19].

Weitere kleine Proteoglykane wie Dekorin, Fibromodulin und Biglykan sind ebenfalls an den funktionellen und strukturellen Eigenschaften der EZM beteiligt.

Einen kleineren Anteil in der EZM, aber keinesfalls minder wichtige Funktionen, nehmen die Glykoproteine ein. Diese können als eine Art akzessorische Proteine angesehen werden. Eines der größten Glykoproteine des Knorpels ist das "cartilage oligomeric protein" (COMP), welches aus fünf zusammen gelagerten Monomeren besteht. COMP kann andere Matrixmoleküle sowie Chondrozytenoberflächen binden und trägt somit zur Vernetzung der EZM bei [29, 30]. Ebenso wie Tenascin, das in gesundem Gelenkknorpel perizellulär vorkommt. Zelloberflächen-assoziierte Glykoproteine wie Fibronectin, Chondronektin, "cartilage matrix glycoprotein" (CMGP) und Anchorin scheinen wichtige Funktionen bei der Verankerung der Chondrozyten in der EZM zu übernehmen.

Chondrocalcin, ein Calcium bindendes Glykoprotein, ist das N-terminale Propeptid von Kol II und somit mit dem Kol II-Metabolismus vergesellschaftet [5].

1.1.3 Besonderheiten der Nährstoffversorgung

Die Nährstoffversorgung des Knorpels bzw. der Chondrozyten erfolgt über die Synovia und wird durch Diffusion oder einem Pumpmechanismus ähnelnden Flüssigkeitsverschiebungen während der Knorpelbelastung ausgetauscht [31]. Als eine besondere Eigenschaft des Knorpels senkt der Glucose-Spiegel den Sauerstoffverbrauch in der gut versorgten oberen Schicht des Gelenkknorpels (Crabtree-Effekt). Die Energie wird hier über den Weg der anaeroben Glykolyse gewonnen. In der basalen Zone wird durch eine aerobe Metabolisierung von Glukose eine deutlich höhere Energieausbeute ermöglicht. Deshalb ist es nicht problematisch, dass die Glukosekonzentration von 5 mM in der Synovia mit zunehmender Knorpeltiefe auf nahezu Null absinkt [32].

1.2 Die degenerative Gelenkerkrankung Osteoarthritis

Die Bezeichnung "Arthritis" leitet sich von der griechischen Bezeichnung für Gelenk (Arthros) ab und wurde 1913 von dem deutschen Internisten Friedrich von Müller erstmals verwendet. Da im Verlauf der Degeneration des Knorpels auch der angrenzende Knochen Veränderungen aufweist, wird sie auch als Osteoarthritis bezeichnet [33].

Die Osteoarthritis ist durch eine progressive Degeneration des artikulären Knorpels gekennzeichnet. Diese stellt die Folge eines Ungleichgewichtes zwischen der Synthese und dem Abbau des Gelenkknorpels dar, welche zu einem flächigen Verlust der Knorpelsubstanz führt. Das röntgenologische Krankheitsbild ist durch eine Gelenkspaltverschmälerung, Knochenumbau und Anpassung (subchondrale Osteosklerose) sowie osteophytäre Randanbauten stadiumsabhängig charakterisiert [34, 35].

Osteoarthritis kann sich im gesamten Gelenk manifestieren und mit Schmerzen, Steifheit sowie Bewegungsbeeinträchtigungen einhergehen. Betroffen sind meist die großen Gewicht tragenden Gelenke (Knie- und Hüftgelenk), die Fingergelenke und die Facettengelenke der Wirbelsäule. Weltweit sind Millionen von Menschen erkrankt. Bereits 40jährige weisen heute zu etwa 50% degenerative Veränderungen an Gelenken auf, wobei 60% der Männer und 70% der Frauen über 65 Jahren von Arthritis betroffen sind [36, 37]. Laut Untersuchungen erhöht sich die Prävalenz und der Schweregrad der Osteoarthritis mit zunehmenden Alter [38], weshalb die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung den Stellenwert der Arthritis Erkrankung erhöhen wird.

Neben primären Arthrosen, welche sich ohne bekannte Ursachen ab einem Lebensalter von 40 Jahren klinisch manifestieren können, ist für sekundäre Arthrosen eine Vielzahl von Induktoren beschrieben. Als mögliche Ursachen müssen beispielsweise Achsfehlstellungen, Übergewicht, Hämophilien, rheumatoide oder bakterielle Arthritiden, Osteochondrosis dissecans, Dysplasien der Gelenke oder Verletzungen des Gelenkknorpels in Betracht gezogen werden [39].

Nach konservativen Behandlungsmöglichkeiten wie Physiotherapie und Medikation zur Schmerzlinderung bleibt meist nur der endoprothetische Ersatz des betroffenen Gelenkes. Schätzungsweise werden in Deutschland jährlich etwa 55.000 Kniegelenk-endoprotheseoperationen durchgeführt [40]. Dabei werden zerstörte Gelenkanteile entfernt und durch Langzeitimplantate ersetzt (Abb. 1).

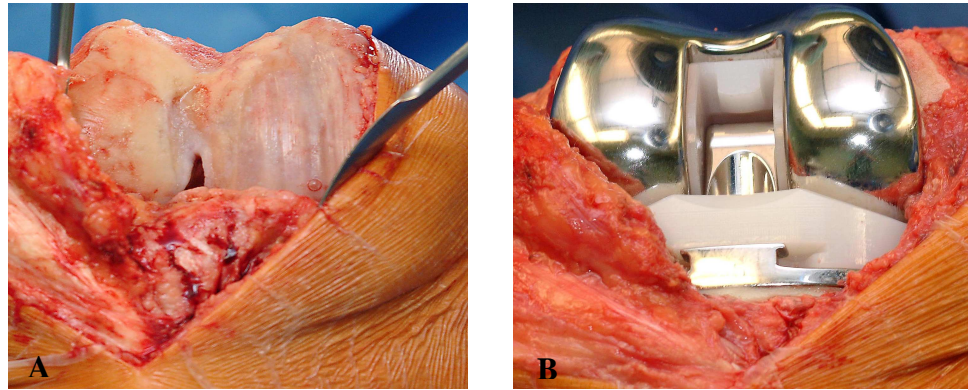


Abb. 1: Intraoperativer Situs vor Implantation einer Knie-Totalendoprothese (A) und OP-Situs nach Implantation einer bikondylären Knie-Totalendoprothese (B). [Quelle: Die Bilder wurden freundlicherweise von Herrn Hardi Hauk, dem Fotografen des Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Eisenberg zur Verfügung gestellt.].

Der Einsatz einer Knieprothese trägt zu einer Verbesserung der Lebensqualität wie Schmerz- und Gehfähigkeitsverbesserung bei, kann aber das Kniegelenk nicht exakt rekonstruieren.

1.2.1 Pathomechanismen der Osteoarthritis

Bei der Osteoarthritis kommt es zur Degeneration des Knorpelaufbaus, wodurch der Knorpel und das Gelenk ihre Funktionalität einbüßen. Diese Destrukturierung ist auf eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Synthese und Abbau der EZM, welches durch die Chondrozyten reguliert wird, zurückzuführen. Die Chondrozyten synthetisieren die Bestandteile der EZM, sind aber gleichzeitig auch für die Synthese von Proteasen und deren Inhibitoren zuständig. Es wird vermutet, dass das Gleichgewicht zwischen Proteasen und den sie kontrollierenden Inhibitoren verschoben ist und die Degradation verstärkt wird [41].

Frühe Stadien der Arthritis sind durch reaktive Zellproliferation und eine erhöhte Synthese von Knorpelmatrixproteinen charakterisiert, welches als ein Reparaturmechanismus interpretiert wird. Hierbei tritt vor allem eine vermehrte mRNA-Expression von Kol II und Aggrekan auf [42, 43]. Die im gesunden Knorpel eher nicht bis gering vorhandenen Kol I und -III werden im Verlauf einer Arthroseentwicklung vermehrt synthetisiert [44]. Diese erhöhte Synthese wird mit ablaufenden Dedifferenzierungsvorgängen in Verbindung gebracht, welche auch bei Monolayerkulturen von Chondrozyten beobachtet werden können. Die vermehrte

Synthese von Kol X und Alkalischer Phosphatase (AP) weist auf die Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps und einer zunehmenden Mineralisierung hin [16, 45].

Die Knorpeldegradation ist durch einen lokalen Verlust an Proteoglykanen und der Spaltung von Kol II gekennzeichnet, welche einen Verlust der elastischen Druckfestigkeit des Knorpels zur Folge hat. Die Anwesenheit der Spaltprodukte hat einen wesentlichen Einfluss auf den Metabolismus der Chondrozyten. Kollagen- und Fibronektinfragmente stimulieren die Interleukin-1 (IL-1)- oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-Abgabe durch Chondrozyten und das umgebende Synovialgewebe. Durch diese Zytokine wird die Proteoglykan- und Kollagensynthese inhibiert und die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bewirkt. Die MMPs werden u.a. von den Chondrozyten synthetisiert, extrazellulär deponiert und nach Bedarf aktiviert.

Im Rahmen einer Arthroseentwicklung wurde eine erhöhte Produktion von MMP-1, -2, -3, -8 und -13 beobachtet [46], die beim Abbau einer Vielzahl von EZM-Bestandteilen eine entscheidende Rolle spielen. Beispielsweise ist die MMP-3 für die Spaltung von Proteoglykanen und die MMP-13 für die Spaltung von Kol II verantwortlich [47]. Die MMP-Inhibition erfolgt durch so genannte TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs), welche passiv auf dem Blutplasma aufgenommen und an Proteoglykanen absorbiert gelagert werden [48]. Ein Verlust von Proteoglykanen führt zum Verlust der Inhibition von Proteasen wodurch ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren zugunsten der MMPs entsteht [49].

Nach Zerstörung der Proteoglykane werden auch die Kollagenfasern angegriffen. Somit erfolgt nach und nach der Verlust der EZM und der damit verbundene Untergang der Chondrozyten. Die strukturelle Veränderung des Knorpels bewirkt den Verlust seiner Funktion.

Um bei Patienten mit Knorpelschäden dem Risiko einer Arthroseentwicklung entgegen zu wirken, wurden im Rahmen des Tissue Engineerings verschiedene Methoden zur Füllung von Knorpeldefekten entwickelt, welche nachfolgend näher betrachtet werden.

1.3 Tissue Engineering

Traumen wie zum Beispiel Sportverletzungen können Knorpeldefekte im Kniegelenk verursachen, die zu einem vorzeitigen Gelenkverschleiß und der Ausbildung einer Arthrose führen können [50]. Durch das so genannte Tissue Engineering, der *in-vitro*-Herstellung von Ersatzgewebe, können vorhandene Knorpeldefekte durch Ersatzgewebe gefüllt werden, um der möglichen Ausbildung einer degenerativen Erkrankung

vorzubeugen. Die erstmals 1987 beschriebene Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) diente der Behandlung von Knorpeldefekten bei Patienten [51] und konnte gute bis sehr gute Ergebnisse erzielen [52, 53]. Bislang wurde die Indikation zur ACT vor allem bei jüngeren Patienten und nicht bei Patienten mit osteoarthrotischen Veränderungen im Knorpel gestellt.

Die ACT hat sich seit ihrer Einführung vor mehr als 15 Jahren zu einem etablierten Verfahren in der Behandlung von Knorpelläsionen entwickelt. Für die klassische ACT nach Brittberg *et al.* werden in einem arthroskopischen Eingriff kleinste Mengen gesunden Spenderknorpels aus dem betroffenen Gelenk entnommen. Anschließend werden die Chondrozyten mittels eines enzymatischen Verdaus isoliert und für 2-3 Wochen als *in vitro*-Kultur expandiert. Die kultivierten Chondrozyten können dann in einer Gelenkoperation unter einen zuvor über den Defekt aufgenähten Knochenhautlappen (Periostlappen) injiziert werden [51]. Ziel ist die Entstehung eines Knorpelgewebes, das dem gesunden Gelenkknorpel in seinen histologischen und biomechanischen Eigenschaften sehr nahe kommt. Die ACT kann auch zur Rekonstruktion großflächiger und tiefer Defekte eingesetzt werden [53-55].

Trotz klinisch meist guter Resultate, weist die klassische ACT Nachteile auf. Beim Fehlen einer stabilen peri-läsionalen Knorpelschulter lässt sich der Periostlappen nur schwer, häufig auch gar nicht, über den Defekt nähen [56]. Bei unzureichender Qualität der kultivierten Chondrozyten oder nach frühzeitiger Abscherung des Periostlappens kann es zu einer qualitativ minderwertigen Defektauffüllung und zu einem Transplantatversagen führen [56, 57]. Zudem bildet sich in manchen Fällen eine Transplantathypertrophie aus, welche vermutlich durch den aufgenähten Periostlappen verursacht wird [54]. Des Weiteren sind die gleichmäßige Verteilung der Chondrozyten im Defekt und mögliche Auswirkungen auf die Matrixsynthese fraglich.

Ein erheblicher Nachteil der klassischen ACT ist die erforderliche weite Eröffnung des Gelenkes und die damit einhergehende Beschädigung des Kapsel-Band-Apparates.

Zur Lösung dieser Probleme wurden verschiedene Biomaterialien für eine Träger-gestützte Form der ACT entwickelt. Durch eine Matrix-gekoppelte ACT (MACT) werden die Chondrozyten nicht wie bisher als Suspension, sondern in eine Trägermatrix eingebunden, in den Defekt implantiert (Abb. 2).

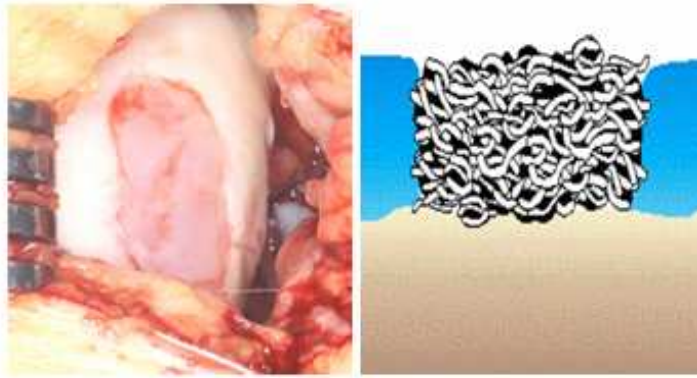


Abb. 2: *Matrix-gekoppelte autologe Chondrozytentransplantation (MACT)* [nach Marlovits]. Defektfüllung mit einem Chondrozyten enthaltenden Kollagen-I-Gel (CaReS®), welches exakt an die Größe des Defektes angepasst und zur Defektfüllung eingebracht werden kann.

Durch den Einsatz dieser MACT kann die Operation minimalinvasiv erfolgen. Eine vollständige Eröffnung des Gelenkes sowie die Gewinnung des Periostlappens sind nicht mehr nötig.

Als Trägermaterialien werden bisher kollagene Membranen und ein kollagenes Gel eingesetzt. Zudem unterliegen synthetische Polymer-Matrices, Hyaluronsäure-basierende Matrices und Peptid-Hydrogele der experimentellen Testung.

Die Einsatzfähigkeit der MACT ist jedoch bei Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen derzeit nur sehr eingeschränkt möglich. Bei diesen meist großflächigen Defekten sind oft auch die restlichen Gelenkflächen vom Krankheitsprozess betroffen. Das Genexpressions- und Stoffwechselprofil dieser Zellen ist abweichend von gesunden Zellen [58]. Weiterhin spielt das meist höhere Alter der Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen eine entscheidende Rolle. Mit zunehmenden Alter nimmt die Mitose- und Syntheseaktivität von Chondrozyten und somit auch die Fähigkeit zur Regeneration hyalinen Knorpelgewebes ab [59]. Deshalb eignen sich vermutlich diese Chondrozyten nicht für die später implantierte Matrix.

Ein allgemeines Problem ist, ausreichende Zellmengen zur Deckung großflächiger Knorpelschäden zu gewinnen. Daher wird bei vielen Varianten der MACT direkt nach der Isolation der Chondrozyten eine Expansionsphase angeschlossen. Durch diese Monolayerkultur wird eine Dedifferenzierung der Zellen in Kauf genommen. Die Chondrozyten bilden einen fibroblasten-ähnlichen Phänotyp und das Genexpressionsmuster sowie die Proteinsynthese werden beeinflusst. Beispielsweise

sinkt die knorpelspezifische Kol II-Expression ab und die für Knochen und Bänder typische Kol I-Expression nimmt zu [60].

Aufgrund dieses Verhaltens der Chondrozyten besteht die Bestrebung, die Dedifferenzierung der Zellen in der Kultur zu minimieren.

In den folgenden Abschnitten sollen die wichtigen Schritte der ACT bzw. MACT, die Chondrozytenisolation und -kultivierung, näher betrachtet werden.

1.3.1 Chondrozytenisolation

Da für das Tissue Engineering eine ausreichende Menge an implantationsfähigen Zellen benötigt wird, standen quantitative Aspekte bei der Zellisolation im Vordergrund. Um eine hohe Zellausbeute zu erlangen wurden verschiedene enzymatische Verfahren, unterschiedliche Verdauzeiten sowie Verdautemperaturen experimentell untersucht [61-63]. Hierbei getestete Verdaumethoden sind beispielsweise ein 6- bzw. 22-stündiger Kollagenase-Verdau sowie ein Trypsin/Kollagenase-Verdau (0,75 h/3 h) und ein Pronase/Kollagenase-Verdau (1,5 h/3 h) von Knorpelgeweben adulter Rinder. Der 22-stündige Kollagenase- und der Pronase/Kollagenase-Verdau erreichte dabei die größte Zellausbeute. Der niedriger konzentrierte 22-stündige Kollagenase-Verdau (0,0015 g/ml) hatte eine fast fünffach höhere Zellausbeute gegenüber dem höher konzentrierten 6-stündigen Kollagenase-Verdau (0,0045 g/ml) zur Folge. Dies zeigte, dass eine längere Verdauzeit einen größeren Effekt auf die Zellausbeute hat, als eine höhere Enzymkonzentration [63].

Weiterhin zeigte die Analyse der Aggrekanexpression der verschiedenen Verdaumethoden, dass die enzymatische Isolation keinen negativen Einfluss darauf zu haben scheint. Hingegen wiesen alle Verfahren, außer dem Pronase/Kollagenase-Verdau, eine signifikant niedrigere Kol II-Expression der Chondrozyten im Vergleich zur unverdauten Kontrolle auf. Dieser Verlust der Kol II-Produktion markiert die Dedifferenzierung und kann somit ein großes Problem für Arbeiten bezüglich der Knorpelregeneration darstellen [63].

Aufgrund dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass der 22-stündige Kollagenase-Verdau und der Pronase/Kollagenase-Verdau die höchste Zellausbeute erzielten, aber Veränderungen in der Genexpression aufwiesen. Der 6-stündige Kollagenase-Verdau hingegen wies die geringste Zellausbeute, aber nur wenige Veränderungen im Genexpressionsmuster auf. Daher empfiehlt die Arbeitsgruppe um Hayman *et al.* für die

Isolation eine Kombination der Verfahren, um die Zellausbeute zu erhöhen und den Einfluss auf die Genexpression zu minimieren [63].

Somit steht neben einer hohen Zellausbeute auch die Beeinflussung der Chondrozyten bzw. deren Genexpression durch das Isolationsverfahren im Mittelpunkt. Da durch eine enzymatische Isolation eine Vielzahl von Matrixfragmenten entstehen, kann durch deren Aktivierung von Metalloproteinasen die Zellfunktion negativ beeinflusst werden (siehe Abschnitt Pathomechanismen). Weiterhin ist unklar, inwieweit Integrine auf der Zellmembran durch eine enzymatische Isolation zerstört werden. Dies hätte Veränderungen im Adhäsionsverhalten und des Genexpressionsprofils der Zellen zur Folge, wodurch ebenfalls die Proteinsyntheseleistung zur Schaffung einer EZM negativ beeinflusst wäre [64]. Im Allgemeinen sind die Chondrozyten während der enzymatischen Isolation einer hohen Belastung ausgesetzt, wodurch deren Genexpressionsprofil beeinflusst wird [63]. Aufgrund dieser Vorgänge stellt sich die Frage, inwieweit der Einfluss auf das Genexpressionsmuster durch Veränderungen im Isolationsverfahren reguliert werden kann.

Zellkulturmedien wie Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), HAM's F-12 oder eine Kombination beider (DMEM/F-12) werden standardmäßig für die Isolation und Kultivierung von Chondrozyten verwendet.

1.3.2 Kultivierung von Chondrozyten

Im Anschluss an die Zellisolation erfolgt meist eine 2D-Kultivierung der Chondrozyten. Diese Kultur dient der Zellproliferation und wird daher auch als Expansionskultur bezeichnet. Zudem wird diese Kultivierung häufig für Untersuchungen von Morphologie und Eigenschaften der Zellen genutzt.

Im Zuge der 2D-Kultivierung von humanen artikulären Chondrozyten kommt es allerdings nicht nur zur gewünschten Proliferation der Zellen, sondern auch zu einer Dedifferenzierung. Dabei treten morphologische Veränderungen von einer sonst rundlichen zu einer fibroblasten-ähnlichen Gestalt auf [65, 66]. Die Dedifferenzierung ist durch Veränderungen in der Genexpression und Syntheseleistung charakterisiert wie beispielsweise einer Erhöhung der Kol I-Expression und einer Reduktion der Kol II-Expression. Während dieser Dedifferenzierung, sind die Chondrozyten in der Lage, in Richtung verschiedener mesenchymaler Phänotypen zu differenzieren. In Abhängigkeit von umgebenden Faktoren können diese Zellen chondrogen, osteogen oder adipogen beeinflusst werden. Um die Differenzierung in diese speziellen Zellphänotypen zu

regulieren, werden deshalb häufig Wachstumsfaktoren während der Expansionskultur eingesetzt [67]. Um die chondrogene Differenzierung bzw. Redifferenzierung zu begünstigen, werden meist die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) und der Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) eingesetzt [68].

Zur Betrachtung des Dedifferenzierungsstatus eignet sich die Untersuchung der Kol I- und Kol II-Expression. Marker für Hypertrophie und Mineralisierung der Zellkultur sind die Kol X-Genexpression und die AP-Aktivität [16, 45].

Im Hinblick auf die bestehende Problematik der Dedifferenzierung während der Expansionskultur wurden 3D-Kultursysteme entwickelt. Die 3D-Kultur bietet den Zellen, ähnlich wie im Knorpelgewebe, eine umgebende Matrix und soll ihnen somit die Möglichkeit einer Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps bieten. Allerdings stellt die 3D-Kultivierung von Chondrozyten keinen Ersatz für die Expansion in 2D-Kultur dar, da durch die dreidimensionale Umgebung der Zellen die Proliferation eingeschränkt ist.

In der Literatur sind bisher viele 3D-Kultursysteme und deren Einflüsse auf die Chondrozyten beschrieben. Beispielsweise führte die Kultivierung der Zellen in sogenannten Alginate Beads zu einem Genexpressionsprofil, welches dem nativen Knorpel ähnelt [69]. Bei der Kultivierung von Chondrozyten in einer Hyaluronsäure-basierenden Matrix konnte eine Reduktion der Metalloproteinasen und die Aktivierung anaboler Vorgänge beobachtet werden [70].

Einige 3D-Kultursysteme befinden sich bereits im Rahmen der MACT in klinischer Anwendung. Hierzu gehört eine kollagenbasierte biphasische Matrix (NOVOCART[®]3D) und ein dreidimensionales Kollagengel (CaReS[®]).

Das kollagene Rohmaterial der NOVOCART[®]3D ist bovinen Ursprungs und besteht aus einer abdeckenden Membran und einem zelltragenden Schwamm mit interkonnektierender Porenstruktur bei definierter Porengröße. Diese Struktur ermöglicht eine homogene Verteilung der Chondrozyten im Transplantat. Durch die additive Verwendung von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat werden die knorpeltypischen Stoffwechselleistungen der eingesäten Zellen zusätzlich stimuliert. Im Tierversuch konnte mit dem Trägermaterial in Verbindung mit phänotypisch weitgehend stabilen Chondrozyten die Regeneration eines Knorpels mit hyalinen Eigenschaften nachgewiesen werden [71].

Das dreidimensionale Matrixkonstrukt CaReS[®] basiert auf einem Kollagen-I-Gel, wobei das Kol I aus Rattenschwänzen gewonnen wird. Die Kultivierung der Chondrozyten in

der 3D-Matrix beginnt direkt nach der Zellisolation aus dem originären Knorpel. Der Vorgang der direkten Zellkultivierung im Gel ermöglicht zum einen eine homogene Zelldistribution und zum anderen eine Minimierung der Dedifferenzierung der Chondrozyten. In *in vitro*-Versuchen mit arthrotischen humanen Chondrozyten zeichnete sich das Kollagengel, im Vergleich zu verschiedenen Membranen, durch eine signifikant höhere Kol II- und eine geringere Kol I-Genexpression aus. Somit wies die Kultivierung von Chondrozyten in einem CaReS[®]-Gelsystem, gegenüber verschiedener Membranen, das beste Kol I zu Kol II-Verhältnis auf [72].

Im Rahmen der Knorpelregeneration spielen Differenzierungs- und Dedifferenzierungsvorgänge sowie Proliferation und Apoptose eine Rolle. Diese Vorgänge können durch bestimmte Signale aktiviert oder inhibiert werden. Der nachfolgende Abschnitt soll einen Einblick über die Signalweiterleitung geben, welche die transkriptionale Aktivität bestimmter Gene reguliert und somit einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der Zellen hat.

1.4 Signalweiterleitung

Die Basis für die Koordination physiologischer Funktionen im Organismus bzw. im Gewebe stellt die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion dar. Dabei können Signale übertragen werden, wodurch jede einzelne Zelle oder Matrixkomponenten das Verhalten anderer Zellen beeinflussen können. Diese externen Signale werden von spezifischen Rezeptoren erkannt und in so genannte intrazelluläre Signalkaskaden übertragen. Durch die intrazelluläre Signalweiterleitung externer Signale, wie Wachstumsfaktoren oder chemischer bzw. physikalischer Stress, kann beispielsweise das Überleben der Zelle sowie die Zellproliferation kontrolliert und reguliert werden [73].

In arthrotischen Chondrozyten sind bisher einige Signalwege beschrieben. Der Wachstumsfaktor IGF-1 kann über den MAPK (mitogen-activated protein kinase)-, PKC (Proteinkinase C)- und PKA (Proteinkinase A)-Weg die Proliferation der Zellen stimulieren [74].

Inflammatorische Faktoren wie IL-1 β oder TNF α tragen zur Knorpeldestruktion bei. Diese können die Proteinkinase I κ B-1 und -2, welche zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, oder Kinasen der MAPK-Kaskade aktivieren [75, 76]. In der Osteoarthritis scheint die MAPK-Kaskade eine bedeutende Rolle zu spielen.

Die über die MAPK-Kaskade aktivierten Transkriptionsfaktoren können beispielsweise die MMP- und Aggrekanasen-Produktion fördern und somit zur Knorpeldestruktion beitragen [77, 78].

Externe Signale wie Zytokine können von Zelloberflächen-Rezeptoren erkannt und in den MAPK-Signalweg über Mitglieder der Ras-Superfamilie (z.B. H-Ras, Rac1) übertragen werden [73]. Die Übertragung erfolgt hierbei durch eine Phosphorylierung der Proteine. Eine Besonderheit aller MAPK-Signalwege ist, dass sie aus drei hintereinander geschalteten Proteinkinasen bestehen, die sich nacheinander durch Phosphorylierung aktivieren. Eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert die MAPK-Kinase (MAPKK), die die jeweilige MAPK aktiviert (Abb.3).

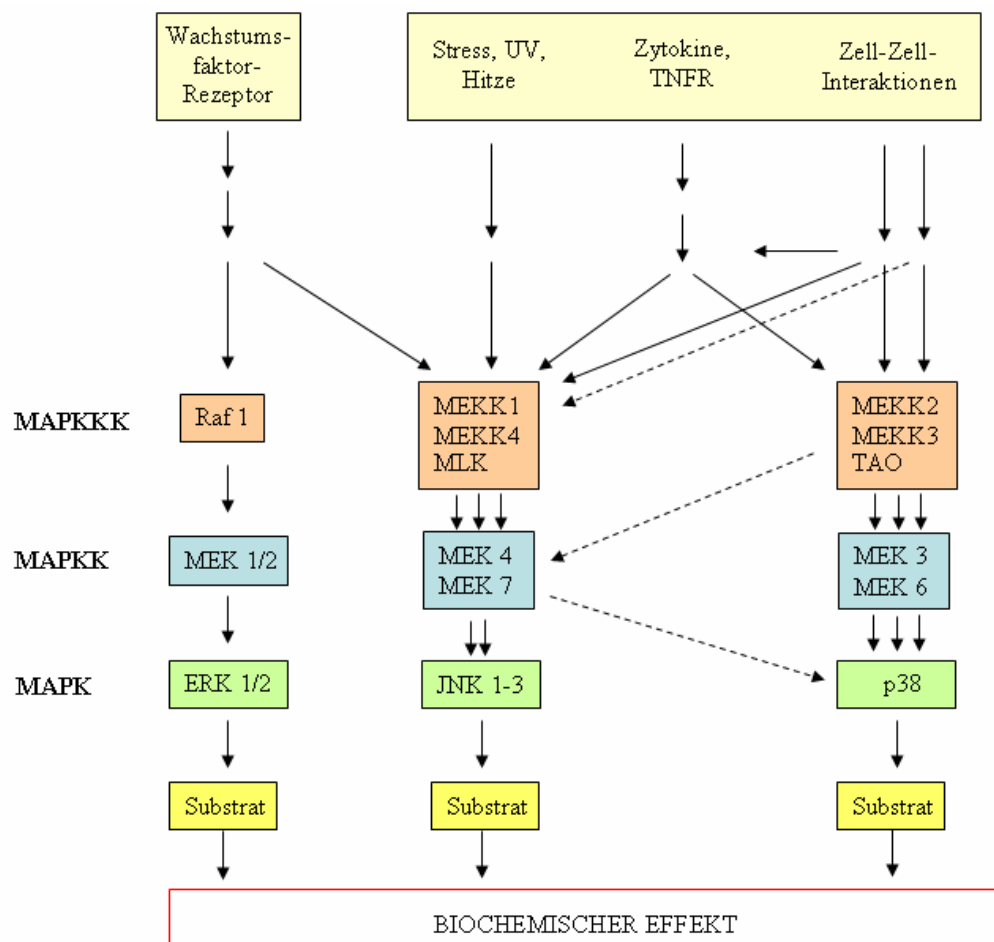


Abb. 3: Vereinfachte Übersicht der drei MAPK-Hauptwege der Mammalia [modifiziert nach Krauss]. Die Darstellung zeigt die Signalweiterleitung der drei Wege sowie deren mögliche multiple Interaktionen. (TNFR-Rezeptor für Tumor Necrosis Factor).

Die am Ende der Signalkaskade stehende Kinase überträgt anschließend das Signal auf Transkriptionsfaktoren oder andere Proteine.

Der MAPK-Signalweg der Mammalia beinhaltet drei Hauptwege. Der ERK (extracellular signal-regulated kinases)-Weg übernimmt Kontrollfunktionen in Proliferation, Transformation und Differenzierung. Der JNK/SAPK (Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase)-Weg sowie der p38 MAPK-Weg werden hauptsächlich durch Stress und Wachstumsfaktoren aktiviert. Zwischen diesen drei Hauptwegen der MAPK-Kaskade sind multiple Interaktionen möglich.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Signale von verschiedenen Proteinkinasen in andere Signalwege übertragen werden [73].

Diese Ausführungen haben gezeigt, dass externe Signale durch eine Kaskade intrazellulär weitergeleitet und auf Transkriptionsfaktoren oder Proteine übertragen werden können, um Einfluss auf die Transkription und letztlich das Verhalten der Zellen auszuüben.

Im folgenden Abschnitt werden ausgewählte Proteine vorgestellt, welche die transkriptionale Aktivität regulieren können.

1.5 Regulation transkriptionaler Aktivität - Histondeacetylasen

Für die Regulation transkriptionaler Aktivität spielt die Verpackung der DNA eine entscheidende Rolle. Die DNA ist ein Bestandteil des Chromatins, welches das Material der Chromosomen darstellt. Chromatin stellt einen Komplex aus DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen dar und setzt sich aus einer Kette mehrerer Nukleosomen zusammen. Diese bestehen aus einem Histonoktamer mit zwei Kopien der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 sowie der darum gelagerten DNA [79].

Durch eine strukturelle Modifikation dieser Histone wird die Genexpression reguliert [80]. Diese Modifikation kann beispielsweise durch eine Acetylierung erfolgen. Diese wird durch zwei Gruppen von Enzymen, den Histondeacetylasen (HDACs) und den Histonacetyltransferasen (HATs), gesteuert. Die Acetylierung von Histonen ist eine posttranslationale Modifikation, welche an den Lysinresten des N-Terminus stattfindet und spezifische Enzyme, die HATs, benötigt. Die Abspaltung der Acetylgruppen kann ebenfalls nur durch spezifische Enzyme, den HDACs, erfolgen.

In der Literatur wird den HDACs eine Rolle in der Regulation des Differenzierungsstatus von Chondrozyten zugesprochen [81]. Aus diesem Grund nehmen sie eine besondere Stellung in dieser Arbeit ein.

HDACs haben einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zelltypen. Sie können Acetylgruppen der Histone abspalten und somit eine Kondensation des Chromatins hervorrufen. Diese Chromatinkondensation verhindert den Zugang von Transkriptionsfaktoren an den Promotor spezifischer Gene und führt somit zur Unterdrückung deren Transkription [82, 83] (Abb. 4).

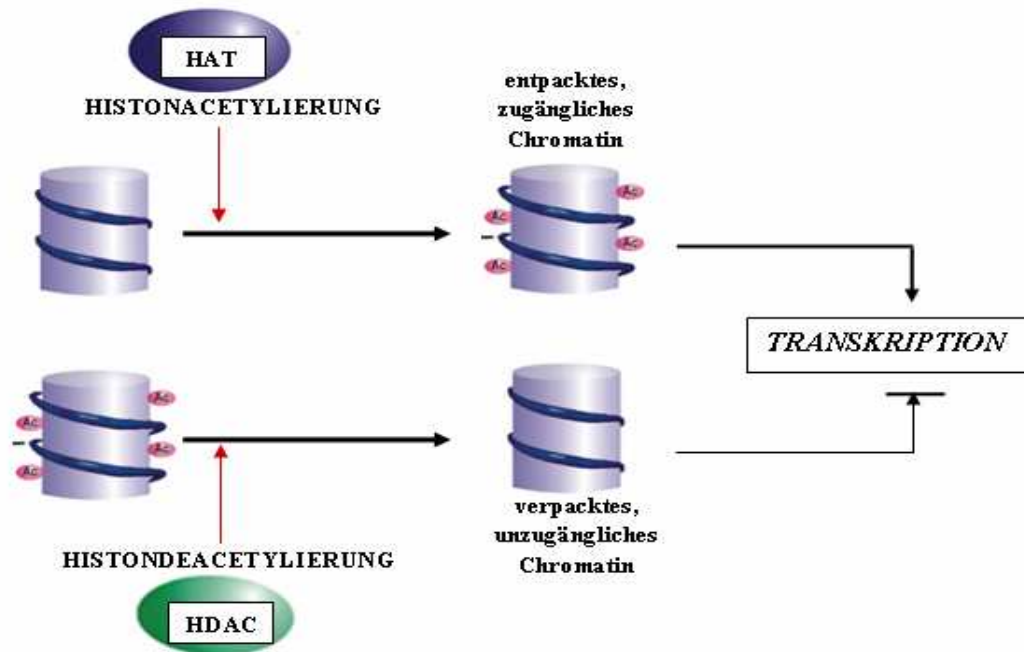


Abb. 4: Schematische Darstellung der Chromatin-Regulation durch HATs und HDACs [modifiziert nach Saha und Pahan]. Durch die Acetylierung der Lysinreste machen HATs das Chromatin zugänglich für die Transkriptions-Maschinerie. HDACs können diesen Prozess umkehren und durch Chromatinkondensation die Transkription inaktivieren.

Bisher sind 18 humane HDACs bekannt, welche in vier verschiedene Klassen unterteilt werden (Abb. 5). Zu Klasse I Enzymen gehören HDAC1, -2, -3 und -8, zu Klasse II Enzymen HDAC4, -5, -6, -7, -9 und -10, zu Klasse III Enzymen Sirt1, -2, -3, -4, -5, -6 und -7 sowie zu Klasse IV Enzymen gehört die HDAC 11 [84]. Die HDACs der Klasse I weisen Sequenzhomologien zu Klasse II und IV HDACs auf und stellen Zink-abhängige Enzyme dar, während die zur Klasse III gehörigen HDACs NAD^+ -abhängig wirken und im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden.

Die HDACs der Klasse I weisen eine katalytische Domäne auf, wobei die HDAC 1, -2 und -3 eine zusätzliche C-terminale Domäne besitzen. HDAC1 und -2 kommen ausschließlich im Zellkern vor, während die HDAC3 auch im Zytoplasma oder an die

Plasmamembran gebunden vorkommen kann [85]. Die HDAC8 konnte in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden, wo sie an der Muskelkontraktion beteiligt ist [86].

Die der Klasse II zugehörigen HDAC6 und -10 weisen zwei katalytische Domänen auf, wobei die zweite Domäne der HDAC10 dysfunktional ist. HDAC4, -5, -7 und 9 besitzen eine katalytische Domäne, eine zusätzliche N-terminale Domäne sowie, HDAC9 ausgenommen, eine zusätzliche C-terminale Domäne. Die HDAC-Klasse II ist durch eine gewebsspezifische Expression charakterisiert und kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor. Im Zellkern können sie an Transkriptionsfaktoren binden und somit die Differenzierung und Hypertrophie im Muskel- und Knorpelgewebe kontrollieren [87, 88].

Die zur Klasse IV gehörigen HDAC11 besitzt eine katalytische Domäne und ist bisher wenig untersucht.

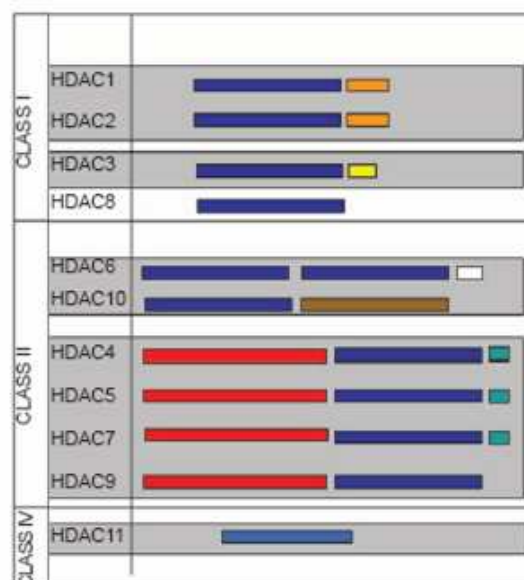


Abb. 5: Zink-abhängige HDACs und deren Domänenstrukturen [nach Gallinari]. HDAC6 besitzt zwei katalytische Domänen (blau), während die zweite Deacetylase-Domäne der HDAC10 dysfunktional ist (braun). Die Klasse II HDACs besitzen N-terminale Verlängerungen (rot). HDAC1, -2 und -3 sowie HDAC 4, -5 und -7 weisen C-terminale Verlängerungen auf.

Die funktionelle Bedeutung einzelner HDACs ist wissenschaftlich gut belegt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass HDAC1 für die craniofaziale Knorpelbildung des Zebrafisches benötigt wird [89]. Weiterhin wiesen Experimente darauf hin, dass durch die Interaktion der HDAC1 mit dem Wachstumsfaktor Leukemia/Lymphoma-related Faktor die Expression von COMP und die Differenzierung der Chondrozyten inhibiert wird [90]. Die HDAC4, welche in

prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, hat eine negative Regulation der Hypertrophie und endochondralen Knochenbildung zur Folge, indem es mit Runx2 interagiert und dieses deaktiviert [88].

Die Aufklärung der Funktion der HDACs ist von großer Bedeutung, da diese als Regulatoren der Transkription einen Angriffspunkt zur Ein- bzw. Ausschaltung von Genen darstellen. Diesbezüglich werden bereits HDAC-Inhibitoren im Rahmen der Krebsforschung untersucht [91, 92].

Für diese Arbeit sind vor allem die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Huh *et al.* von großem Interesse. Huh *et al.* konnten zeigen, dass HDACs die Kol II-Expression begünstigen, indem sie die Transkription von Wnt-5a unterdrücken [81]. Somit scheinen HDACs zur Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps beizutragen.

1.6 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die Behandlung großflächiger Gelenkknorpelschäden stellt bis heute ein schwerwiegendes Problem in der Orthopädie dar. Durch das Fehlen von Therapieansätzen bleibt im Rahmen degenerativer Erkrankungen wie Osteoarthritis meist nur die Endoprothetik, um die betroffenen Gelenkanteile wieder herzustellen.

Die Weiterentwicklung der klassischen ACT zu einer biomechanisch stabilen MACT ermöglicht eine Indikationserweiterung auf größere Gewebedefekte.

Für beide Verfahren sind die Isolierung und die Vermehrung autologer Chondrozyten essenziell. Die Isolierung und Vermehrung von Chondrozyten führen jedoch zu massiven phänotypischen Veränderungen, einem Vorgang, der als Dedifferenzierung bezeichnet wird.

Bezüglich der Zellisolation aus Knorpelgewebe ist die Zellausbeute in den Vordergrund getreten. Dazu wurden verschiedene Enzyme, Isolationszeiten und Temperaturen untersucht, um möglichst viel Ausgangsmaterial bereitstellen zu können [61, 62].

Die Gruppe um Danika M. Hayman berichtete über einen entscheidenden Einfluss der Chondrozytenisolation auf deren Genexpressionsmuster und Vitalität bzw. Zellausbeute [63].

Diese Arbeiten belegen, dass die Isolation der Chondrozyten aus Knorpelgewebe einen wichtigen Schritt für die ACT bzw. MACT darstellt. Die Phase der Zellisolation sollte vor allem bei Arbeiten mit arthrotisch verändertem Knorpelgewebe in den Vordergrund rücken, um mögliche Weichen für die Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps zu stellen.

Deshalb scheint die Entwicklung von Isolationsverfahren, welche den chondrozytären Phänotyp und die Zellvitalität stabilisieren, notwendig zu sein.

In Standardkulturmedien werden zur Chondrozytenisolation Glucosekonzentrationen von 5,6 bzw. 25,2 mM (1,0 bzw. 4,5 g/l) verwendet. Im Vergleich zur Glucosekonzentration im Knorpel, welche mit zunehmender Knorpeltiefe von 5 mM auf nahezu Null absinkt [32], sind diese recht hoch. Die Notwendigkeit hoher Glukosekonzentrationen während der Kultur, die zur Proliferation und Syntheseleistungen beitragen, steht außer Frage. Allerdings stellt sich die Frage, ob ein Substratüberschuss während der Isolation günstig für den Chondrozytenstoffwechsel ist.

Immerhin haben die Chondrozyten *in vivo* ein niedriges Substratangebot und weisen einen niedrigen Stoffwechsel auf [9].

Aus diesem Grund scheint eine Reduktion des Nährstoffangebotes während der Isolation der Chondrozyten sinnvoll. Sie könnte es ermöglichen, die Zellen in ihrer natürlichen metabolischen Situation zu halten und so vielleicht zu einer Reduktion der Dedifferenzierung beizutragen.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es, die Dedifferenzierung von Chondrozyten in der Isolationsphase zu analysieren und diese durch den Einsatz des nährstoffarmen Isolationsmediums zu reduzieren. Ein weiteres Ziel war es, diesen Effekt auch in nachfolgender 2D- oder 3D-Kultur nachzuweisen sowie Auswirkungen der veränderten Isolationsbedingung auf regulatorische Elemente der Genexpression zu untersuchen.

1. Charakterisierung und Bestimmung des Genexpressionsprofils von Chondrozyten nach Isolation und anschließender 2D- oder 3D-Kultivierung
 - Zellzahlbestimmung
 - Aktivität der AP
 - Genexpression ausgewählter Markergene (Kol I, -II, -X und MMP-3)
2. Untersuchung der Zellregulation während der 2D-Kultivierung
 - Chipanalyse
 - Genexpression ausgewählter Gene bezüglich der Chipanalyse-Daten
 - Protein- bzw. Aktivitätsnachweis ausgewählter Proteine bezüglich der Chipanalyse-Daten

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gelenkknorpel

Für die durchgeführten Arbeiten wurde Gelenkknorpel, welcher durch Totalendoprotheseoperationen zur Verfügung gestellt werden konnte, sowie daraus isolierte humane Chondrozyten verwendet.

Der für die Experimente verwendete artikuläre Humanknorpel stammte von Patienten im Alter von 53 - 82 (Altersdurchschnitt: 75) Jahren, die sich einer Kniegelenkoperation unterzogen. Die Gewebeproben wurden freundlicherweise vom Waldkrankenhaus "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg zur Verfügung gestellt (Genehmigung der Ethikkommission der FSU Jena, Bearbeitungsnummer: 1789-05/06). Als Auswahlkriterium stand die Diagnose einer Osteoarthritis, bei welcher durch die Auswertung der klinischen Daten sekundäre Osteoarthrosen und entzündliche Erkrankungen ausgeschlossen werden konnten.

Die im Rahmen des Eingriffs anfallenden Knorpel-Knochen-Resektate (hauptsächlich Femurkondylen, zum Teil Tibiaplateaus) wurden unmittelbar nach der operativen Entnahme unter Wahrung der Sterilität aufgearbeitet.

2.1.2 Primer

Die folgenden Primer wurden für die quantitative Real-Time-PCR verwendet. Die Primer stammten aus der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller Universität Jena und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Primer

<i>Gen</i>	<i>Produktlänge (bp)</i>	<i>Sequenz Primer a und b (5'→3')</i>
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	254	CAT CAC TGC CAC CCA GAA GA CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG
Kollagen Typ I (A2)	509	AGA CCC AAG GAC TAT GAA GT ACA TCA TTA GAG CCC TGT AG

Kollagen Typ II (A1)	107	CAA CAC TGC CAA CGT CCA GAT CTG CTT CGT CCA GAT AGG CAA T
Kollagen Typ X (A1)	424	CCT CTT GTT AGT GCC AAC CAG GAG CCA CTA GGA ATC CTG AG
MMP-3	221	TGG AGA TGC CCA CTT TGA TGA TG GAG GTC CAT AGA GGG ACT GAA TG
MMP-13	327	TTT CCT CCT GGG CCA AAT TAT GG TCG GAG ACT GGT AAT GGC ATC
HDAC1	158	CGG AGA TCC CTA ATG AGC TT CGG CAG CAT TCT AAG GTT CT
HDAC2	123	GAC AGG GTC ATC CCA TGA AG TTG TCA TTT CTT CGG CAG TG
HDAC3	150	TCG GGT GCT CTA CAT TGA CA TCT GCC CCG ACT TCA TAC AT
HDAC4	157	AGC AGG AGC CCA TTG AGA G GAC GCC TGG TAG TTC CTC AG
HDAC5 (Spleißvariante 1,6,7)	200	AGT GAC ACC GTG TGG AAT GA AGT TTT GCG GTG ATG GCT AC
HDAC5 (Spleißvariante 2,3,4,5)	184	GTC TCC TTC TCT GCC CAA CA GCA GCC AGG AAT AGA GGA TG
HDAC6	181	GGC CGC ATT ATC CTT ATC CT GCC AGT ATC TGC GAT GGA CT
HDAC7A	121	TCT CCA CAA GGA CAA GAG CA GCT GTT GGG ATG GAC TGT TC
HDAC8	100	TGA TCA TCC GGA CTC CAT AG TGT GAT CGT AGC CCC TCC TA
HDAC9	173	CAA ATG GTT TCA CAG CAA CG CTA AGC GTC TGC GTC TCA CA
HDAC10	150	CTC ACT GGA GCT GTG CAA AA GAGGATCCTGTGTAGCCCGT
HDAC11	177	GCG CTA CAA CAT CAC CTT CA TTA AGA TAG CGC CTC GTG TG

2.1.3 Chemikalien

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose	BIO-RAD Laboratories, CA, USA
Aktivkohle (2,5 mm)	Merck KGaA, Darmstadt
Alkalische Phosphatase (D27123)	Calbiochem [®] , Merck KGaA, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
BSA-Albumin Fraktion V	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagenase P, > 1,5 U/mg	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-Cystein	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) D5648	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA (Ethylendiaminetetra-acetic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol (100%), unvergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Lot 94K3397	Taufkirchen
FDA (Fluorescein Diacetat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Hoechst Dye (33258)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver (Blotting grade)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich, 0,2 µm Pore Size	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
nukleasefreies Wasser	Omniscript ® RT Kit (QIAGEN, Hilden)
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent(10x)	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS (saliner Phosphatpuffer)	GIBCO, Invitrogen Corporation, UK
Pronase E, 4 µU/g	Merck KGaA, Darmstadt
PI (Propidiumiodid, 95%)	Sigma-Aldrich, CA, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
pUC 19/Msp /DNA Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RIPA Lysis Buffer (1x)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
See Blue® Plus2	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck KGaA, Darmstadt
Sodium Orthovanadate	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
SYBR® Green Supermix	BIO-RAD Laboratories, CA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt
TRIzol® Reagent	Invitrogen , Carlsbad, CA, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme und gebrauchsfertige Produkte

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Testsysteme

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Affymetrix Genechip (HG-U133Plus 2.0)	Affymetrix	Analyse der RNA-Expression
HDAC Fluorimetric Cellular Activity Assay-AK-503	BIOMOL	Bestimmung der HDAC-Aktivität
NuPage® 4-12% Bis-Tris Gel (1,5 mm x 10 well)	Invitrogen	Gelelektrophorese für Western Blot
Omniscript® RT Kit	QIAGEN	reverse Transkription
Pro Long® Antifade Kit	Molecular Probes (Invitrogen)	Einbettung histologischer Präparate
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN	RNA-Isolation
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	PIERCE, PERBIO	Proteindetektion für Western Blot
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen	Polymerase-Ketten-Reaktion
TOPO TA Cloning® Kit PCR 2.1-TOPO Vector	Invitrogen	Standardplasmide für qRT-PCR

2.1.5 Antikörper

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Konzentration</i> ($\mu\text{g/ml}$) <i>Western Immun-</i> <i>Blot fluores.</i>	<i>Spezies</i>
Alexa Fluor 488 goat anti- mouse IgG (2. Antikörper)	Molecular Probes (Invitrogen)	20	Maus
Alexa Fluor 594 goat anti- mouse IgG (2. Antikörper)	Molecular Probes (Invitrogen)	20	Maus
Alexa Fluor 488 goat anti- rabbit IgG (2. Antikörper)	Molecular Probes (Invitrogen)	20	Kaninchen
Alexa Fluor 594 goat anti- rabbit IgG (2. Antikörper)	Molecular Probes (Invitrogen)	20	Kaninchen

Anti-ERK (Purified Mouse anti-ERK)	BD Biosciences Pharmingen	0,25	Maus
Anti-HDAC1	MBL International	10	Kaninchen
Anti-HDAC2	MBL International	4	Kaninchen
Anti-HDAC3	MBL International	10	Kaninchen
Anti-HDAC4	MBL International	10	Kaninchen
Anti-HDAC6	MBL International	20	Kaninchen
Anti-HDAC6 (phospho S22)	Abcam	10	Kaninchen
Anti-HDAC8	MBL International	10	Kaninchen
Anti-JNK (SAPK/JNK Antibody)	Cell Signaling	1:1000	Kaninchen
Anti-Human Kol I	MP Biomedicals, LLC	2	Maus
Anti-Human Kol II	MP Biomedicals, LLC	2	Maus
Anti-p38 (p38 MAP Kinase Antibody)	Cell Signaling	1:1000	Kaninchen
Anti-phospho-ERK (P44/42 MAPK)	Cell Signaling	1:1000	Maus
Anti-phospho-JNK	BD Biosciences Pharmingen	0,25	Maus
Anti-phospho-p38 (MAPK)	Cell Signaling	1:1000	Kaninchen
Goat Anti-Mouse HRP-conjugated (2. Antikörper)	PIERCE	0,01	Ziege
Goat Anti-Rabbit HRP-conjugated (2. Antikörper)	PIERCE	0,01	Ziege

2.1.6 Reagenzien

Medien für Zellkulturen

DMEM-Medium: 13,4 g Dulbecco's modifiziertes Eagle
(DMEM) Medium (DMEM)
3,70 g Natriumbicarbonat (NaCO_3)
1 Liter hochreines Wasser, pH 7,4

Minimalmedium: 9,00 g NaCl
(MINI) 3,70 g Natriumbicarbonat (NaCO_3)
0,161 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat
($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
0,11 g D-Glukosemonohydrat ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
1 Liter hochreines Wasser, pH 7,4

Serum für Zellkulturen

Humanserum: Serum aus einem Patientenpool (~ 400 Patienten),
zur Verfügung gestellt durch das Zentrallabor des
Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg mit
Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller
Universität Jena

Lösungen und Ansätze

Trypsin-EDTA in PBS: 0,02% EDTA in PBS lösen
0,05% Trypsin
pH 7,25
steril filtrieren
Lagerung bei -20°C

TBE-Puffer: 0,5 M Tris
(5-fach) 0,5 M Borsäure
10 mM EDTA
1 Liter Aqua dest.
Gebrauchslösung: 0,5-fach
Lagerung bei RT

2%-iges Agarosegel:	100 ml 0,5-fach TBE-Puffer 2 g Agarose wiederholtes Aufkochen (Mikrowelle) bis Lösung homogen 5 µl Ethidiumbromid (Stock: 10 mg/ml)
Elektrophorese-Puffer:	1 Liter 0,5-fach TBE-Puffer 45 µl Ethidiumbromid (Stock: 10 mg/ml) Lagerung bei 4°C
Ladepuffer: (6-fach)	1% Orange G in 25 mM EDTA 50% Glycerin
TBS:	150 mM NaCl 50 mM Tris Lösen in Reinstwasser pH 7,5 Lagerung bei RT
TBS-T:	1 Liter TBS 500 µl Tween [®] 20
Tritonlösung:	in TBS (pH 7,5) 0,1% Triton-X-100 (v/v) Lagerung bei RT
3%-Tris/Albumin-Lösung:	3 g BSA-Albumin Fraktion V 100 ml TBS
5%-BSA-Lösung:	5 g BSA-Albumin Fraktion V 100 ml TBS-T
5% Milch-Lösung:	5 g Milchpulver 100 ml TBS-T

Laufpuffer für Proteingel: 950 ml Aqua dest.

50 ml NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)

Transferpuffer für

Western Blot: 50 ml NuPAGE® Transfer Buffer (20x)

1 ml NuPAGE® Antioxidant

100 ml Methanol

849 ml Aqua dest.

Stripping-Puffer für

Western Blot: 62,5 mM Tris

20 ml 10% SDS

(kurz vor Gebrauch: 7 µl 2-Mercaptoethanol/ ml Puffer)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Knorpelpräparation und Chondrozytenisolation

Das Abschälen des Knorpels vom subchondralen Knochen erfolgte mittels Skalpell und Pinzette. Es wurde sich hierbei in erster Linie auf die makroskopisch unversehrten, hyalinen Anteile des bestehenden Restknorpels beschränkt, um die weniger stark arthrotisch veränderten Chondrozyten als Ausgangsmaterial verwenden zu können.

Ein Teil des Knorpelgewebes (ca. 100 mg) wurde mittels flüssigen Stickstoffs gefroren und als native, unbehandelte Knorpelgewebssprobe bei -80°C gelagert. Das verbleibende Knorpelgewebe wurde in salinem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, mit einem Skalpell zerkleinert und auf zwei Verdaugefäße (Spinnerflasche, Wheaton Science Products) verteilt, so dass beide identisches Material enthielten.

Die Destruktion der Knorpelmatrix wurde zunächst in mit Pronase E (1 mg/ml, 4000 U/ml) versetzten Kulturmedien (20 ml) ohne Serumzusatz eingeleitet. Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37°C und 5% CO₂, wobei die Verdaugefäße in Verbindung mit Magnetrührern eine gleichmäßige Bewegung des Verdauansatzes gewährleisteten. Anschließend wurden die Verdaumedien vorsichtig abgenommen und das verbleibende Knorpelmaterial 3-mal mit PBS gewaschen, um die Reste der Pronase zu entfernen. Im Anschluss erfolgte eine weitere ca. 22-stündige Verdauphase in den entsprechenden mit

Kollagenase P versetzten (0,2 mg/ml, 0,678 U/ml) und 5% Humanserum (HuS, Aktivkohle-behandelt) enthaltenden Medien, welche ebenfalls unter ständiger Bewegung bei 37°C und 5% CO₂ stattfand.

Für einen Vorversuch und einen Serumvergleichstest erfolgte der Knorpelverdau unter Verwendung von 5% fetalem Kälberserum (FKS, Sigma).

Für die Chondrozytenisolation wurde DMEM als Standardmedium im Vergleich zu einem nährstoffarmen Medium (Minimalmedium, MINI) verwendet. Alle verwendeten Kulturmedien wurden vor ihrer Verwendung steril filtriert und waren antibiotikafrei.

Nach der Chondrozytenisolation über Nacht wurden die Verdaulösungen über ein Nylon Zellsieb (100 µm, BD FalconTM) filtriert, um vorhandene Matrixbestandteile zu entfernen. Nach wiederholter Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Centrifuge 5415 D, Eppendorf) der Verdauung in PBS wurde das Zellpellet in 2 ml PBS aufgenommen. Unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer konnte anschließend die Zellzahl bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase(AP)-Aktivität wurde je Verdaubedingung ein Zellpellet von jeweils 2x 100.000 Zellen bei -80°C gelagert.

Weiterhin wurden jeweils 1.000.000 Zellen für anschließende Kulturen verwendet und die verbleibenden Zellen in 1 ml TRIzol[®] (Invitrogen) aufgenommen und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

Für einen Vorversuch wurden die Chondrozyten von 8 Patienten in einem 5% FKS-supplementierten Kulturmedium isoliert.

Für einen Serumvergleichstest wurden die Chondrozyten von 6 Patienten in einem 5% FKS- oder HuS-supplementierten Kulturmedium isoliert und in einer 2D-Kultivierung expandiert.

Nach der Chondrozytenisolation in DMEM oder MINI (5% HuS) von 12 Patienten, wurden die isolierten Zellen von 6 Patienten für eine 2D-Kultivierung (10 d), die der weiteren 6 Patienten für eine 3D-Kultivierung (12 d) verwendet (Abb. 6). Nachfolgend wurden isolierte Chondrozyten von weiteren 6 Patienten für eine 2D-Kultivierung (5 d) bereitgestellt.

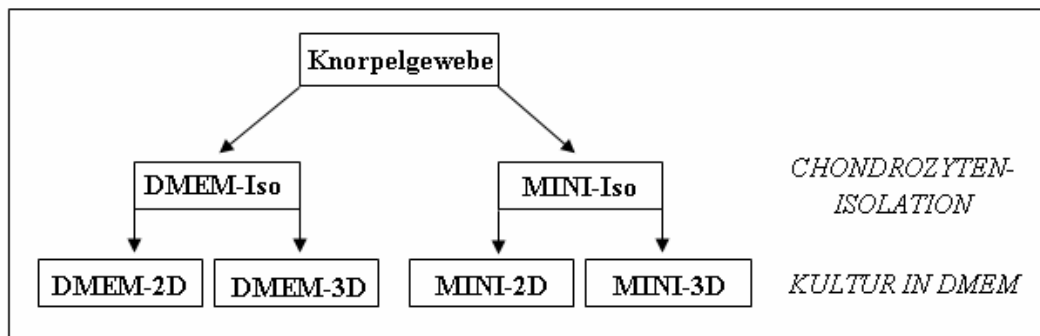


Abb. 6: Übersicht der Chondrozytenisolationen und anschließenden Kulturen. Aus zur Verfügung gestelltem Knorpelgewebe von 12 Patienten konnten Chondrozyten im DMEM- oder MINI-Isolationsmedium gewonnen werden. Die isolierten Zellen von je 6 Patienten wurden für die 2D- bzw. 3D-Kultivierung verwendet.

2.2.1.2 2D-Kultivierung von Chondrozyten

14 d-Kulturen für Serumvergleichstest

Für einen Serumvergleichstest wurden von 6 Patienten je 100.000 in DMEM, unter Zusatz von 5% FKS oder 5% HuS, isolierte Chondrozyten für 14 d bei 37°C und 5% CO₂ als Monolayerkultur in einer Kulturschale (Becton Dickinson, Falcon 353003, USA) inkubiert. Dabei wurde ein Doppelansatz verwendet. Anschließend wurde deren Zellzahl durch Auszählung am Mikroskop bestimmt und die Zellen durch Aufnahme in 1 ml TRIzol® (Invitrogen) für die RNA-Isolation (1 Kulturschale) und durch Abschaben für die Bestimmung des Proteoglykangehaltes (1 Kulturschale) bereitgestellt. Zur Proteoglykanbestimmung wurden 2 ml Mediumüberstand und Zellpellets bei -20°C gelagert.

10 d-Kulturen

Für die 2D-Kultivierung der in DMEM oder MINI isolierten Zellen (Abb. 6) wurden jeweils 1.000.000 Zellen in DMEM unter Zusatz von 5% HuS für 10 d in einer Zellkulturflasche (175 cm², Becton Dickinson, Falcon REF 353112, USA) bei 37°C und 5% CO₂ als Monolayerkultur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA in PBS (1:10 Verdünnung) abgelöst, in PBS (15% HuS) aufgenommen und in PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Centrifuge 5415 D, Eppendorf) konnte die vitale Zellzahl mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung bestimmt werden. Zur Bestimmung des Proteoglykangehaltes wurden zu Beginn 2 ml des

Mediumüberstandes entnommen sowie Zellpellets von 100.000 Zellen bei -20°C gelagert.

Zur Messung der AP-Aktivität wurden Zellpellets von jeweils 2x 100.000 Zellen bei -80°C gelagert. Die verbleibenden Zellen wurden in 1 ml TRIzol® (Invitrogen) aufgenommen und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

5 d-Kulturen

Für die 2D-Kultivierung der in DMEM oder MINI isolierten Zellen von 6 Patienten wurden jeweils 1.000.000 Zellen in DMEM unter Zusatz von 5% HuS für 5 d in einer Zellkulturflasche (75 cm², Becton Dickinson, Falcon 353136, USA) bei 37°C und 5% CO₂ als Monolayerkultur inkubiert. Dabei wurde ein Doppelansatz für beide Verdaubedingungen verwendet.

Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA in PBS (1:10 Verdünnung) abgelöst, in PBS (15% HuS) aufgenommen und in PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Centrifuge 5415 D, Eppendorf) konnte die vitale Zellzahl mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung bestimmt werden. Zur Proteinbestimmung, wurden Zellpellets von 500.000 Zellen entnommen und bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung der AP-Aktivität wurden Zellpellets von je 2x 100.000 Zellen bei -80°C gelagert. Zur Messung der HDAC-Aktivität wurden jeweils 100.000 Zellen direkt für den Assay verwendet.

Die verbleibenden Zellen wurden in 1 ml TRIzol® (Invitrogen) aufgenommen und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 3D-Kultivierung von Chondrozyten

Für die 3D-Kultivierung wurde ein Kollagen-I-Gel laut Gavenis *et al.* hergestellt [72]. Dafür wurden 150.000 in DMEM oder MINI isolierte Chondrozyten (Abb. 6) in eine Gelneutralisationslösung (GNL; Arthro Kinetics) unter Zusatz von 20% HuS resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend mit dem gleichen Volumen einer Kollagen-I-Lösung (Arthro Kinetics) bei 4°C gemischt und in eine 6-Well-Kulturplatte (6 ml/Well, 5 Gele) gegeben. Nach einer Inkubation für 20 min bei 37°C und 5% CO₂ wurde das polymerisierte Gel mit 3 ml DMEM (10% HuS) überschichtet und für 12 d bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums DMEM fand in einem 4-tägigen Rhythmus statt.

Nach Beendigung der Kultivierung von 12 d wurde ein Gel in DMEM unter Zusatz von 0,2 mg/ml Kollagenase P für ca. 40 min bei 37°C unter ständigem Schütteln verdaut. Anschließend wurde diese Suspension zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, Centrifuge 5415D, Eppendorf) und in PBS gewaschen. Zur Bestimmung der AP-Aktivität wurden Zellpellets von 2x 100.000 Zellen bei -80°C gelagert. Für die RNA-Isolation wurden pro Bedingung 2 Gele mechanisch zerkleinert, in 4 ml TRIzol® (Invitrogen) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Ein Gelstück von ca. 200 mg wurde zur Proteoglykanbestimmung bei -20°C gelagert. Ein weiteres Gel wurde halbiert, wobei ein Teil für histologische Untersuchungen präpariert und ein Teil für die FDA (Fluorescein Diacetat)/PI (Propidiumiodid)-Färbung verwendet wurde.

2.2.1.4 Behandlung des Humanserums

Das gepoolte HuS wurde im Wasserbad für 1 h bei 56°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde dieses mit Aktivkohle (0,01 g/ml) versetzt und für 1 h bei 4°C geschüttelt. Nach einer Sedimentation über Nacht bei 4°C konnte das Serum dekantiert und die verbleibende Aktivkohle zentrifugiert (20 min, 10.000g, 4°C, Centrifuge 5810 R, Eppendorf) werden. Das Aktivkohle-behandelte Serum wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Charakterisierung der Seren

Die Bestimmung der Glucosekonzentration sowie die Konzentration verschiedener Hormone im HuS und FKS wurden im medizinischen Zentrallabor des Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg bestimmt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des TRIzol®-Reagenz und wurde weitestgehend den Herstellerangaben (TRIzol®, Invitrogen) entsprechend durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden kurz dargestellt:

RNA-Isolation aus Chondrozyten

- a. Auftauen des TRIzol[®]-Zell-Lysates und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT)
- b. Hinzufügen von 200 µl Chloroform/ml TRIzol[®], mehrfaches Schütteln und weitere Inkubation bei RT für ca. 3 min
- c. Zentrifugieren für 15 min bei 12.000 g, 4°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf)
- d. nach erfolgter Phasentrennung: Überführen der wässrigen, RNA-haltigen Schicht in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß und Präzipitation der RNA durch Mischen mit 500 µl Isopropanol/ml eingesetzten TRIzol[®], Inkubation für 10 min bei RT
- e. Zentrifugieren: 10 min, 12.000 g, 4°C
- f. alle Arbeiten auf Eis: Verwerfen des Überstandes und Waschen der gefällten RNA mit etwa 1 ml 75 %igem EtOH (4°C)
- g. Zentrifugieren: 5 min, 7.500 g, 4°C (Wiederholung der Schritte f und g)
- h. Verwerfen des Überstandes und bei 42°C 20 - 30minütiges Trocknen der RNA auf einem Thermoblock (ThermoStat, Eppendorf)
- i. Aufnahme des RNA-Pellets je nach Größe in 12,5 µl bzw. 25,0 µl RNase-freiem Wasser (Promega Corp.)
- j. Umschreibung der RNA (siehe reverse Transkription)

RNA-Isolation aus nativem Knorpelgewebe

Die bei -80°C gelagerten Knorpelgewebe wurden in 2 ml TRIzol[®]-Reagenz mittels einer abgeflammt Schere maximal zerkleinert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (3 min, 12.000 g, 4°C) konnte der Überstand von den vorhandenen Knorpelresten abgenommen und zu gleichen Teilen aufgeteilt werden, so dass pro Probe je 1ml des Überstandes zur Verfügung stand. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde mit Schritt b (siehe oben) fortgesetzt.

Im Anschluss an die Phasentrennung wurden die Überstände beider zusammengehöriger Reaktionsgefäße vereint und die RNA-Isolation folgte weiter dem oben beschriebenen Schema.

RNA-Isolation aus Chondrozyten für den Affymetrix Genechip® (HG-U133Plus 2.0)

Um die RNA aus Chondrozyten zu isolieren und für die Analyse mittels eines Affymetrix Genchip zur Verfügung zu stellen, musste ein phenolfreies Isolationsverfahren angewandt werden. Die RNA-Isolation erfolgte unter Zuhilfenahme des RNeasy® Mini Kit und wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Im Anschluss an die RNA-Isolationen wurden die RNA-Konzentrationen mittels des Spectrophotometers NanoDrop (ND-1000, peqLab, Erlangen) bestimmt.

2.2.2.2 Qualitätsprüfung der RNA

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde der Agilent RNA 6000 Nano Kit den Herstellerangaben entsprechend genutzt. Die Messung wurde am Bioanalyzer RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) durchgeführt, dessen Nutzung freundlicherweise von dem Max Bürger Forschungszentrum (MBZ), Interdisziplinäres Zentrum klinischer Forschung (IZKF), Universität Leipzig ermöglicht wurde.

2.2.2.3 Reverse Transkription

1 µg der isolierten RNA wurde mittels Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany), den Herstellerangaben entsprechend, in cDNA umgeschrieben. Diese Proben wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation der gewünschten cDNA wurde der Taq PCR Master Mix Kit verwendet. Dabei wurden der folgende Reaktionsansatz (Tab. 5) und das folgende PCR-Protokoll (Tab. 6; Mastercycler gradient, Eppendorf) durchgeführt.

Tab. 5: Reaktionsansatz für die PCR

Master Mix	12,5 µl
H ₂ O	9,5 µl
Primer a	1 µl
Primer b	1 µl
DNA-Template (Probe)	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 6: PCR-Protokoll

<i>PCR Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	
Denaturierung	94°C	30 s	} 35 Zyklen
Primeranlagerung (Annealing)	60°C	45 s	
Polymerisation (Elongation)	72°C	45 s	
Verlängerung	72°C	10 min	
Abkühlen und Halten	4°C	∞	

2.2.2.5 Gelelektrophorese

Zur PCR-Auswertung wurden die PCR-Produkte bzw. deren DNA-Banden mittels Gelelektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt, welches durch wiederholtes Aufkochen eine homogene Lösung darstellte und durch Abkühlen polymerisierte. Vor Auftragung der PCR-Produkte wurden 15 µl der Proben mit 3 µl Ladepuffer vermischt.

Anschließend wurde das Agarosegel mit 5 µl DNA-Marker (pUC 19/Msp) und 15 µl der PCR-Produkte beladen. Die Elektrophorese wurde in einem Elektrophorese-Puffer in einer dafür vorgesehenen Gelkammer (BIO-RAD SUB-Cell[®] GT) bei 100 V für ca. 1h (BIO-RAD Power Pac 300) durchgeführt. Zur Erstellung des Gelbildes diente der Fluor-S[®]-MultiImager (Bio-Rad).

2.2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR

Vor Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde von allen cDNA-Proben eine 1:10 Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser hergestellt.

Die qRT-PCR erfolgte am iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, USA) unter Verwendung von spezifischen Primern (siehe Tab. 1).

Mit Hilfe der spezifischen Primer und dem TOPO TA Cloning[®] Kit wurden für die meisten Gene Standardplasmide hergestellt, welche anschließend durch Sequenzierung kontrolliert (JenaGen GmbH) wurden. Die Verwendung der Standardplasmide ermöglichte die Berechnung der Kopienzahl des untersuchten Gens. Standen keine Standardplasmide zur Verfügung wurde der so genannte Schwellenwertzyklus

(*threshold cycle*, Ct-Wert), der Zyklus in welchem das Fluoreszenzsignal erstmal als statistisch signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz gemessen wird, ausgewertet.

Die Genexpression wurde mittels des delta Ct-Wertes (bezogen auf GAPDH) bzw. des delta delta Ct-Wertes (bezogen auf GAPDH und Vergleichsprobe) dargestellt [93]. Bis auf die absoluten Verdaudaten wurden alle ermittelten Daten auf das *housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert, um den relativen Anteil der einzelnen Gene an der genetischen Gesamtaktivität bestimmen und vergleichen zu können.

Für alle qRT-PCR-Proben wurden der folgende Reaktionsansatz (Tab. 7) und das folgende Protokoll (Tab. 8) verwendet.

Tab. 7: Reaktionsansatz für die qRT-PCR

Master Mix:	
iQ TM SYBR [®] Green Supermix	9,9 µl
Primer a (10 µM)	0,3 µl
Primer b (10 µM)	0,3 µl
	10,5 µl
DNA-Template (Probe, Standard)	9,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 8: qRT-PCR-Protokoll

<i>qRT-PCR Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Denaturierung	95°C	120 s
Denaturierung	94°C	20 s
Primeranlagerung (Annealing)	60°C	20 s
Polymerisation (Elongation)	72°C	20 s
		40 Zyklen
Denaturierung	95°C	60 s
Schmelzkurvenerstellung	60°C - 95°C	jeweils 10 s in 0,5°C Schritten (70 Zyklen)
Abkühlen und Halten	10°C	∞

2.2.2.7 Affymetrix-Chip-Analyse

Die Analyse der RNA-Expression erfolgte unter Verwendung eines Affymetrix Genechip® HG-U133Plus 2.0 und wurde am Ostdeutschen Referenzzentrum für Microarrayanalytik (ORMA), Interdisziplinäres Zentrum klinischer Forschung (IZKF), Universität Leipzig durchgeführt. Anschließend wurde das RNA-Expressions-Verhältnis der zwei untersuchten Bedingungen gebildet und für die weitere Auswertung verwendet.

2.2.2.8 HDAC-Profilerstellung

Die cDNA von Normalknorpelgewebe wurde freundlicherweise von PD Dr. Oliver Pullig (Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg) zur Verfügung gestellt.

Zur HDAC-Profilerstellung wurden von 5 Normalknorpelgeweben sowie von 5 arthrotischen Knorpelgeweben das HDAC-Expressionsprofil mittels qRT-PCR erstellt.

Zur Überprüfung der HDAC4 wurden Proben von 10 Patienten, zur Prüfung der HDAC7 und -10 wurden Proben von 5 Patienten in die PCR eingesetzt.

Primäre Tubulusepithelzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Magarete Goppelt-Strübe (Medizinische Klinik 4 des Universitätsklinikum Erlangen) zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Bestimmung der AP-Aktivität

Die Bestimmung der AP-Aktivität erfolgte, den Herstellerangaben entsprechend, mit Hilfe eines AP-Chemilumineszenztests (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Das Chemilumineszenz-Signal, welches sich proportional zur AP-Konzentration verhält, wurde für 500 sec. am Fluor-S®-MultiImager (Bio-Rad) gemessen. Die Standardkurve der AP-Aktivität und derer Chemilumineszenz wurde unter Verwendung einer AP (Calbiochem, Darmstadt, Germany), als Kontrollenzym, nach Neuwirth *et al.* [93] erstellt. Die Enzymaktivitäten wurden als μU pro 100.000 Zellen berechnet.

2.2.3.2 Bestimmung des Proteoglykangehaltes (DMB/DNA-Assay)

Zur Bestimmung des Proteoglykangehaltes, wurden die bei -20°C gelagerten Zellpellets über Nacht bei 60°C mittels Papain (125 µg/ml in 0,1 M NaH₂PO₄, 5 mM EDTA, 5 mM L-Cystein; pH 7,0) verdaut. Der DMB-Assay wurde nach Chandrasekhar *et al.* [94] durchgeführt, wobei die Messungen in den Mediumüberständen und in den Zellen separat stattfanden. Um die Gesamtmenge an Proteoglykanen bzw. GAG's bestimmen zu können, wurden die Werte auf den DNA-Gehalt der Proben normalisiert (µg GAG/ µg DNA, Mittelwerte ± SEM (Standardfehler der Mittelwerte)). Der DNA-Gehalt der Chondrozyten wurde mit Hilfe von Hoechst Dye (33258; Sigma-Aldrich) quantifiziert. Alle Proben wurden in PBS verdünnt und je 1 Volumenanteil der Probe wurde mit 9 Volumenanteilen der Dye-Arbeitslösung (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl; pH 7,0 und 10 µg/ml Hoechst Dye) vermischt. Die Standardkurve wurde durch Vermessung einer DNA von Kalbsthymus (Sigma-Aldrich) erstellt und die Messung des DNA-Gehaltes erfolgte an einem Fluorimeter (BIO-TEK SFM 25, BIO-TEK Instruments; Exzitation: 350 nm, Emission: 450 nm).

2.2.3.3 HDAC-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der HDAC-Aktivität wurde der HDAC Fluorimetric Cellular Activity Assay-AK-503 (BIOMOL) den Herstellerangaben entsprechend angewandt.

Zur Bestimmung der HDAC-Aktivität wurden pro Probe 100.000 Zellen verwendet. Die Messung erfolgte am FLUOstar Optima Reader (BMG Labtechnologies, Offenburg).

2.2.3.4 Zelllysis zur Proteinbestimmung

Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Zellpellets in 500 µl RIPA-Lösung (10 µl PMSF, 10 µl Sodium Orthovanadate, 15 µl Proteaseinhibitor pro 1 ml RIPA-Lysis Puffer) aufgenommen und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 min, 10.000 g, 4°C; Centrifuge 5810 R, Eppendorf) konnte der proteinreiche Überstand abgenommen werden. Die Proben wurden direkt auf ein Proteingel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Gelelektrophorese eines Proteingels

Zur Gößenauftrennung der Proteine wurde ein NuPage[®] 4-12% Bis-Tris Gel (1,5 mm x 10 well) und die dafür vorgesehenen Elektrophoresekammer (Invitrogen Novex Mini Cell) verwendet.

Vor der Auftragung wurden die Proben reduziert, wobei folgende Ansatz verwendet wurde (Tab. 9).

Tab. 9: Ansatz zur Reduktion der Proben

Probe	6,5 µl
NuPage® LDS-Sample Buffer (4x)	2,5 µl
NuPage® Reducing Reagent (10x)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Bei Auftragung höherer Volumina wurden die Reagenzien verhältnismäßig eingesetzt. Zur Reduktion der Proben wurden diese für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend mit einem Volumen von 20-40 µl in die Taschen des Proteingels gegeben. Als Marker wurden 4 µl See Blue® Plus2 aufgetragen. Dem Laufpuffer in der oberen Kammer wurde 500 µl NuPage® Antioxidant zugegeben und die Gelelektrophorese bei 100 V für 1 h (BIO-RAD Power Pac 300) durchgeführt.

2.2.3.6 Western Blot

Zuerst wurden die Schwämme, Filterpapiere und Blotmembranen (Nitrozellulose) in dem Transferpuffer getränkt. Der Zusammenbau des Blots wurde in Laufrichtung von Anode zu Kathode in einer dafür vorgesehenen Box (Invitrogen X Cell II™ Blot Module) nach folgendem Schema durchgeführt (für zwei Proteingele): zwei Blotschwämme, Filterpapier, 1. Proteingel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, Blotschwamm, Filterpapier, 2. Proteingel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, 2 Blotschwämme.

Das Blotten erfolgte in der dafür vorgesehenen Elektrophoreskammer (Invitrogen Novex Mini Cell) bei 30 V für 1 h (BIO-RAD Power Pac 300), wobei die obere Kammer mit Transferpuffer und die untere Kammer mit Aqua dest. gefüllt waren.

Nach erfolgtem Blotten der Proteine auf die Nitrozellulosemembranen wurden diese für 1 h in einer 5%-igen Milch-Lösung auf einem Schüttler bei RT geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in 5%-igen BSA- (Spezies: Maus) oder Milch-Lösung (Spezies: Kaninchen) bei 4°C (über Nacht).

Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen 3 x 5 min mit TBS-T auf einem Schüttler bei RT gewaschen und anschließend für 1 h mit dem 2. Antikörper (gegen die verwendete Spezies des 1. Antikörpers) in einer 5%-igen Milch-Lösung auf dem

Schüttler bei RT inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut mit TBS-T gewaschen.

Zur Detektion der Proteine wurden die Membranen mit Super Signal West Femto (1:1 Verhältnis von Stable Peroxide Buffer und Luminol/Enhancer Solution) für 5 min inkubiert. Die Proteindetektion erfolgte durch die Chemilumineszenzmessung (500 sec.) am Fluor-S[®]-MultiImager (Bio-Rad), wobei das Austrocknen der Membran durch Einlegen in eine Plastikfolie vermieden wurde. Die Membranen konnten anschließend verworfen werden oder für eine weitere Proteindetektion "gestrippt" werden. Um die Membranen zu "strippen", also die bereits gebundenen Antikörper abzulösen, wurden sie für 10 min im Stripping-Puffer bei 50°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in TBS-T konnte mit dem Inkubationsschritt des 1. Antikörpers und den darauf folgenden Schritten fortgefahren werden.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 FDA (Fluorescein Diacetat)/PI (Propidiumiodid)-Färbung

Zur Vitalitätsbestimmung der Chondrozyten in der 3D-Kultur wurde eine FDA (Fluorescein Diacetat)/PI (Propidiumiodid)-Färbung angewandt.

PI ist durch eine hohe DNA-Affinität und eine geringe Membranpermeabilität charakterisiert. Somit werden tote oder sterbende Zellen durch dieses detektiert (rote Fluoreszenz). Das hoch Membran-permeable FDA hingegen wird durch vitale Zellen zu Fluorescein hydrolysiert (grüne Fluoreszenz).

Zur Durchführung dieser Färbung wurden mit dem Skalpell kleine Gelstücke (2x 5mm) präpariert, welche anschließend für 5 min in sterilem PBS gewaschen wurden. Danach wurden diese in der FDA/PI-Färbelösung, bestehend aus einem Volumenanteil FDA (1,34 µg/ml) und einem Volumenanteil PI (10 µg/ml), für 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS konnten die Zellen im Gel mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert 200M, Carl Zeiss) analysiert werden. Die grüne Fluoreszenz (520 nm) zeigte vitale Zellen, die rote Fluoreszenz (600 nm) hingegen die toten Zellen. Zur Hintergrundbestimmung wurde ebenfalls ein Kollagen-I-Gel ohne Zellen gefärbt und analysiert.

2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Zum Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden Chondrozyten nach Isolation in DMEM oder MINI unter Zusatz von 5% HuS auf Objektträgern (BD Falcon, Culture Slides REF 354108, REF 354118, USA) kultiviert. Dafür wurden 20.000 Zellen pro Well in 500 µl DMEM (5% HuS) für 5 d bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen kurz in TBS gewaschen und für 10 min mit 70%-igem Ethanol fixiert. Danach wurden die Zellen 3x5 min in TBS gewaschen und für 10 min in TBS + 0,5% Triton permeabilisiert.

Nach weiteren Waschschritten (5x5 min) in TBS wurden die Zellen über Nacht mit dem 1. Antikörper, verdünnt in 3% Tris/Albumin + 0,1% Triton), bei 4°C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in TBS gewaschen (5x5 min) und mit dem 2. Antikörper, verdünnt in 3% Tris/Albumin, für 3 h bei 37°C inkubiert.

Nach mehreren Waschschritten (5x5 min) in TBS wurde eine Dapi-Kernfärbung angeschlossen. Dabei wurden die Zellen für 5 min bei RT mit Dapi (0,5 µg/ml+ 0,1% Triton in PBS) inkubiert und anschließend 2x5 min in Aqua dest. gewaschen.

Nachdem die Präparate auf einer Heizplatte (40°C) getrocknet waren, wurde diese mittels Pro Long[®] Antifade Kit eingebettet.

Für Kontrollfärbungen wurde nur der für die jeweilige Färbung verwendete 2. Antikörper aufgetragen.

2.2.5 Auswertung

2.2.5.1 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit dem Software-Programm SPSS 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicgo, IL, USA) durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (standard error mean, SEM) sowie zusätzlich als Median in den Grafiken dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Anwendung des Mann-Whitney U-Tests. Signifikante Unterschiede wurden mit folgenden Symbolen gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

2.2.5.2 Signalwege der Affymetrix-Chip-Analyse

Zur Erstellung der möglichen Signalwege wurden die Chipdaten unter Verwendung der Kyoto Enzyklopädie der Gene und Genome ([www. genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte ausschließlich unter Betrachtung der in beiden Vergleichsproben detektierten Expressionen.

3. Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung des Einflusses der Isolationsmedien DMEM und MINI auf humane Chondrozyten nach Isolation sowie nach anschließender 2D- oder 3D-Kultivierung. Dabei wurden, in Anlehnung an die ACT, die Isolations- bzw. Kulturmedien mit 5% HuS supplementiert.

3.1 Einfluss von FKS und HuS auf Chondrozytenisolation und -expansion

Zur Charakterisierung des gepoolten HuS und dessen Einfluss auf das chondrozytäre Verhalten fand ein Vergleich mit kommerziell erhältlichem FKS statt. Dabei wurden 5% HuS oder 5% FKS als Zusatz in den Isolations- und Kulturmedien verwendet.

3.1.1 Chondrozytenisolation

Da für die nachfolgenden Experimente die Isolationsmedien DMEM und MINI von Bedeutung sind, wurden diese für den Serumvergleich während der Isolation verwendet. Um den Einfluss von HuS und FKS auf die Isolation humaner Chondrozyten mittels der Isolationsmedien DMEM oder MINI zu untersuchen, wurden Chondrozyten aus Knorpelgeweben in beiden Isolationsmedien unter Zusatz von 5% FKS oder 5% HuS isoliert. Durch die Betrachtung der Zellausbeute und des Genexpressionsprofils konnte der Einfluss der beiden verwendeten Seren sowie der beiden Isolationsmedien auf die Chondrozytenisolation charakterisiert werden.

Beim Vergleich der erzielten Zellzahlen nach der Chondrozytenisolation unter Verwendung von HuS oder FKS waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Tab. 10).

Tab. 10: Einfluss von HuS und FKS auf die Zellausbeute nach Isolation humaner Chondrozyten in DMEM (DMEM-Iso) oder MINI (MINI-Iso).

	<i>DMEM-Iso</i> (5% <i>HuS</i>)	<i>DMEM-Iso</i> (5% <i>FKS</i>)	<i>MINI-Iso</i> (5% <i>HuS</i>)	<i>MINI-Iso</i> (5% <i>FKS</i>)
Mio. Zellen pro g Gewebe	5,11 ± 0,32	4,26 ± 0,5	3,76 ± 0,41	3,09 ± 0,31

Die Zellzahlen sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Signifikante Unterschiede unter Zusatz von HuS oder FKS konnten mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test ausgeschlossen werden. Die Daten der Chondrozytenisolation unter Zusatz von FKS wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Alexander Brodhun erstellt.

Die Isolationen mit HuS, sowohl in DMEM als auch in MINI, wiesen etwas höhere Zellausbeuten auf. Weiterhin zeigten sich, verglichen zu den Isolationen in MINI, höhere Zellausbeuten nach den Isolationen in DMEM.

Zum Vergleich des Genexpressionsprofils nach Chondrozytenisolation unter Zusatz von 5% FKS oder 5% HuS wurden deren Einfluss sowie der Einfluss der beiden Isolationsmedien DMEM und MINI unter Zusatz des jeweiligen Serums separat betrachtet (Abb. 7).

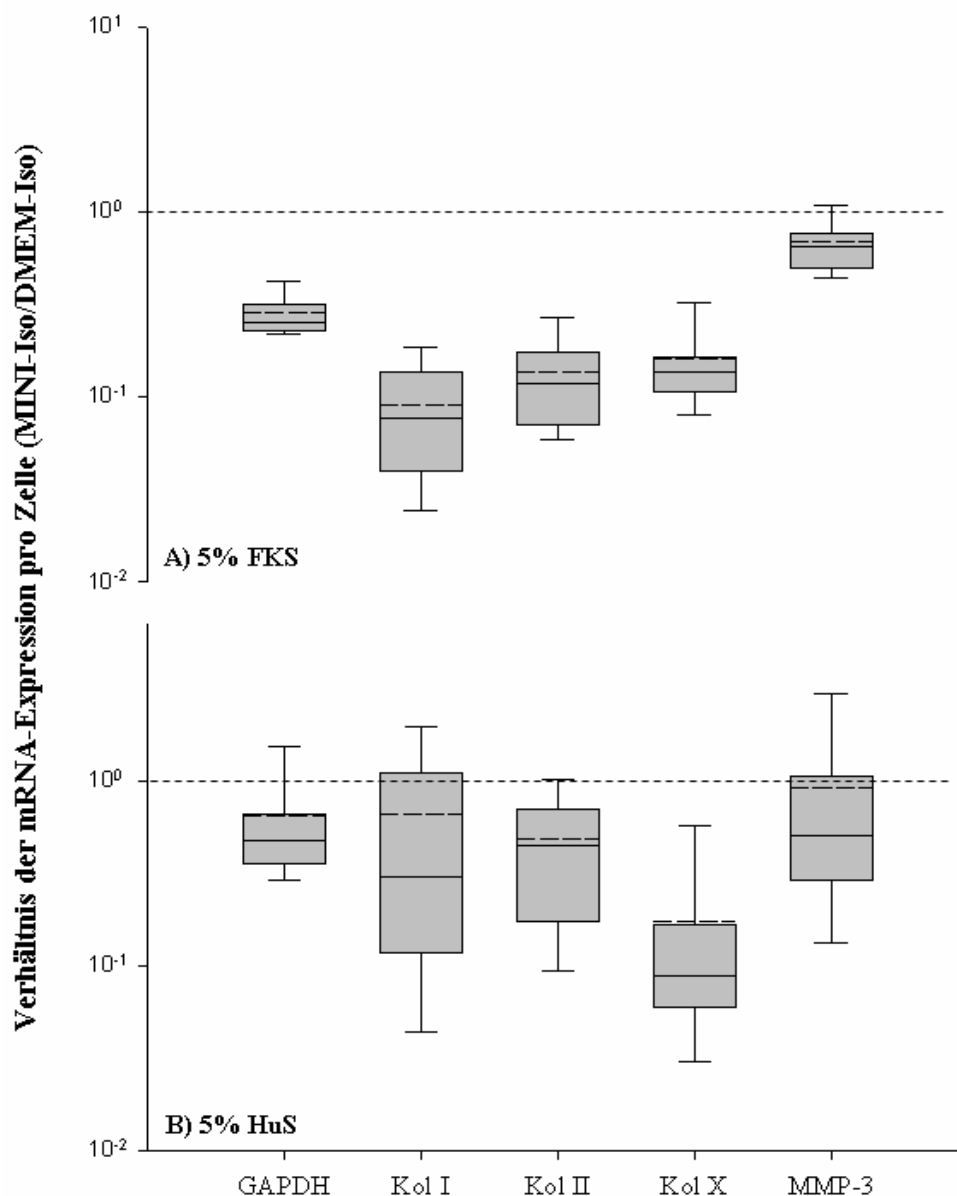


Abb. 7: Reduktion der mRNA-Expression nach Chondrozytenisolation in MINI, unter Zusatz von FKS (A) oder HuS (B), verglichen mit der Standardisolation in DMEM. Untersucht wurden die Expressionen von GAPDH, der Kollagene I, -II und -X sowie der MMP-3 direkt nach Chondrozytenisolation in DMEM oder MINI mittels qRT-PCR. Die Daten sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —).

Hierbei wurden die Genexpressionsdaten nach MINI- und DMEM-Isolation, unter Zusatz von 5% FKS oder 5% HuS, als Verhältnis berechnet und dargestellt.

Die Chondrozytenisolation in MINI, unter Zusatz von FKS (A), hatte eine Reduktion der mRNA-Expression pro Zelle (MINI-Iso/DMEM-Iso) zur Folge. Dabei war die mRNA-Expression der GAPDH um 75%, des Kol I um 92%, des Kol II um 88%, des Kol X um 87% und die der MMP-3 um 35% reduziert.

Unter Zusatz von 5% HuS (B) zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der mRNA-Expression durch die Isolation in MINI. Dabei war die mRNA-Expression der GAPDH um 53%, des Kol I um 70%, des Kol II um 55%, des Kol X um 91% und die der MMP-3 um 50% reduziert.

Im Vergleich der Genexpressionen unter Zusatz von FKS (A) ließ sich nach Isolation in MINI eine stärkere Reduktion der mRNA-Expression pro Zelle verzeichnen als unter Zusatz von HuS (B).

Zur Kontrolle und weiteren Charakterisierung des HuS wurden die Glucose- und Hormonkonzentrationen der beiden verwendeten Seren bestimmt und verglichen.

Diese Bestimmung zeigte höhere Konzentrationen im adulten HuS als im fetalen Serum (Tab.11).

Tab. 11: Bestimmung der Serumkonzentrationen des HuS und FKS von Glucose, Insulin, IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor-1), PTH (Parathormon) und Östradiol (E2).

<i>Serum</i>	<i>Glucose (mmol/l)</i>	<i>Insulin (μU/ml)</i>	<i>IGF-1 (mg/ml)</i>	<i>PTH (pg/ml)</i>	<i>Östradiol (E2) (pg/ml)</i>
HuS	5,11	3,4	105	27	31
FKS	2,56	<1	67	<5	<10

Diese Charakterisierung wurde freundlicherweise vom medizinischen Zentrallabor des Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg, unter der Leitung von Herrn Dr. Brand, durchgeführt.

Allerdings wurden für die Isolations- und Kulturmedien jeweils nur ein Anteil 5% der Seren eingesetzt. Somit war beispielsweise die Glucosekonzentration im Isolationsmedium unter Zusatz von 5% HuS nur um 1,19-fach, gegenüber dem Zusatz von 5% FKS, erhöht.

Die bestimmten Werte befanden sich im Normalbereich der jeweiligen Parameter.

3.1.2 Chondrozytenexpansion

Da für diese Arbeit nicht nur die Isolation, sondern auch die Expansion von Chondrozyten von Bedeutung war, wurden die Seren HuS und FKS im Rahmen einer 2D-Kultivierung charakterisiert. Zur Untersuchung beider Seren wurden humane Chondrozyten unter Zusatz von 5% HuS oder 5% FKS für 5 Tage in DMEM kultiviert und anschließend entsprechend ihrer Morphologie und Proliferationsrate sowie ihres Proteoglykangehalt und ihrer Genexpression verglichen.

Bei der Betrachtung der Morphologie wiesen die Zellen in DMEM plus 5% HuS (A) keinen Unterschied zu den in DMEM plus 5% FKS (B) kultivierten Zellen auf (Abb.8).

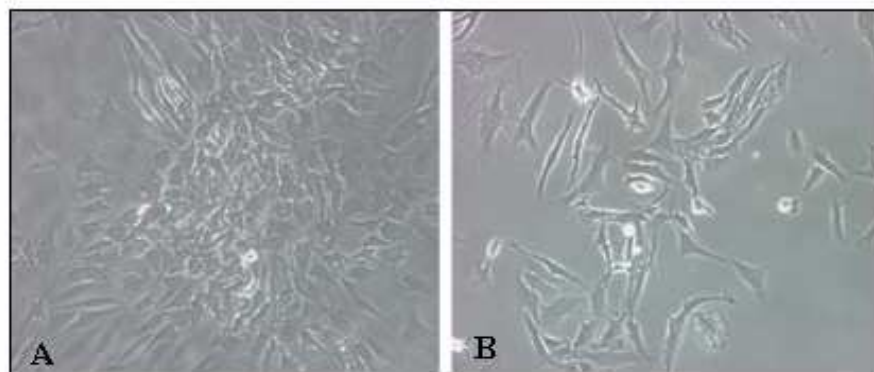


Abb. 8: Morphologie der humanen Chondrozyten nach 14-tägiger 2D-Kultur in DMEM unter Zusatz von 5% HuS (A) oder 5% FKS (B). Originalvergrößerung 20x10.

Die 2D-Kultivierung der Chondrozyten hatte in beiden Fällen die Ausprägung einer fibroblasten-ähnlichen Morphologie zur Folge. Außerdem war nach der Kultivierung in DMEM plus 5% HuS (A) eine höhere Zelldichte sichtbar.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Proliferationsrate sowie der Proteoglykangehalt beider Kulturen ermittelt. Dabei wiesen die in DMEM plus 5% HuS kultivierten Chondrozyten eine signifikant höhere Proliferationsrate als die in DMEM plus 5% FKS kultivierten Chondrozyten auf (Tab. 12).

Tab. 12: Einfluss von HuS und FKS auf die Proliferationsrate und den Proteoglykangehalt (GAG/DNA).

<i>Serum</i>	<i>Proliferationsrate</i>	<i>GAG/DNA (µg/µg)</i>
HuS	7,834 ± 2,43**	3,979 ± 1,35
FKS	3,228 ± 0,74	6,271 ± 1,24

Die Proteoglykan-Werte wurden mit Hilfe eines DMB-Assays erhoben.

Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt und sind mit folgendem Symbol dargestellt ** p ≤ 0,01.

Der Proteoglykangehalt hingegen war nach Kultivierung in DMEM plus 5% FKS 1,6-fach höher als nach Kultivierung in DMEM plus 5% HuS.

Um mögliche Einflüsse des HuS und FKS auf die Genexpression der Chondrozyten nach einer 14-tägigen 2D-Kultivierung in DMEM untersuchen zu können, wurde deren Genexpressionsprofil bestimmt (Tab. 13).

Tab. 13: Übersicht der Genexpression humaner Chondrozyten nach 14-tägiger 2D-Kultur in DMEM unter Zusatz von 5% HuS oder 5% FKS.

<i>Serum</i>	<i>mRNA Expression</i> (normalisiert auf GAPDH; Verhältnis Kopienzahl)			
	Kol I	Kol II	Kol X	MMP-3
HuS	3,99 ± 1,49	3,89 ± 1,12	0,005 ± 0,00**	0,03 ± 0,00**
FKS	2,97 ± 0,64	3,35 ± 0,42	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,02

Untersucht wurden die Expressionen der GAPDH, der Kollagene I, -II und -X sowie der MMP-3 mittels qRT-PCR. Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt und sind mit folgendem Symbol dargestellt ** $p \leq 0,01$.

Im Vergleich der kultivierten Chondrozyten in DMEM plus 5% HuS und DMEM plus 5% FKS konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kol I- und -II-mRNA-Expression festgestellt werden. Die Kol X- und MMP-3-Expression der Zellen waren nach Kultivierung in DMEM plus 5% HuS signifikant niedriger als nach Kultivierung in DMEM plus 5% FKS. Im Allgemeinen, waren die der Kol X- und MMP-3-Expression, bezogen auf GAPDH, sehr niedrig.

Insgesamt gesehen zeigten die Untersuchungen, dass im Vergleich zu FKS auch unter Verwendung von HuS eine mRNA-Reduktion pro Zelle durch die Chondrozytenisolation in MINI möglich ist. Weiterhin konnten unter Zusatz von HuS nach Isolation höhere und nach 2D-Kultivierung signifikant höhere Zellausbeuten erzielt werden. Bezüglich der Morphologie, des Proteoglykangehaltes sowie der Kol I- und -II-Expression waren die Kulturen unter Zusatz von HuS oder FKS vergleichbar. Die Verwendung von HuS hatte nach 2D-Kultivierung eine signifikant reduzierte Kol X- und MMP-3-Expression der Chondrozyten zur Folge.

3.2 Einfluss des Minimalmediums auf die Chondrozytenisolation und anschließende Kultivierung

3.2.1 Chondrozytenisolation, 2D- und 3D-Kultivierung

Um den Einfluss von Isolationsmedien auf die Chondrozyten zu untersuchen, erfolgte die Isolation humaner Chondrozyten in DMEM oder MINI unter Zusatz von 5% HuS. Ob sich isolationsbedingte Regulationen auf anschließende 2D- oder 3D-Kultivierungen in DMEM (plus 5% HuS) auswirken, wurde nachfolgend untersucht.

Hierfür wurden die Zellausbeute, Morphologie und Vitalität, Genexpression, der Proteoglykangehalt sowie die AP-Aktivität bestimmt.

Zur Ermittlung der Zellausbeute wurden nach der Chondrozytenisolation in DMEM oder MINI und der jeweils anschließenden 2D- oder 3D-Kultivierung in DMEM die Zellzahlen bestimmt und verglichen (Tab. 14).

Tab. 14: Einfluss der Isolationsmedien DMEM oder MINI auf die Zellausbeute humaner Chondrozyten nach der Isolation sowie nach anschließender 2D- oder 3D-Kulturen in DMEM.

<i>Isolations-medium</i>	<i>Isolation (Mio. Zellen pro g Gewebe)</i>	<i>2D-Kultur in DMEM (Mio. adhärenzte Zellen pro 1 Mio. ausgesät)</i>	<i>3D-Kultur in DMEM (Tausend Zellen pro 150.000 ausgesät)</i>
DMEM	5,11 ± 0,32	2,73 ± 0,28	145 ± 27,46
MINI	3,76 ± 0,41**	1,28 ± 0,33**	106 ± 34,85

Alle Kulturmedien waren mit 5% HuS supplementiert. Die erhaltenen Zellzahlen wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt und sind mit folgendem Symbol dargestellt ** p≤ 0,01.

Die Isolation in MINI hatte direkt nach Isolation als auch nach der 2D-Kultivierung in DMEM eine signifikant geringere Zellausbeute zur Folge. Durch die 2D-Kultivierung nach Isolation in DMEM konnte eine Expansion der Chondrozyten erreicht werden. Hingegen wiesen die in MINI isolierten und anschließend in DMEM kultivierten Zellen keine Expansion auf.

Nach der 3D-Kultivierung im Kollagen-I-Gel war keine Proliferation der Chondrozyten zu verzeichnen.

Weiterhin wurden die morphologischen Eigenschaften sowie die Vitalität der Chondrozyten bestimmt (Abb. 9).

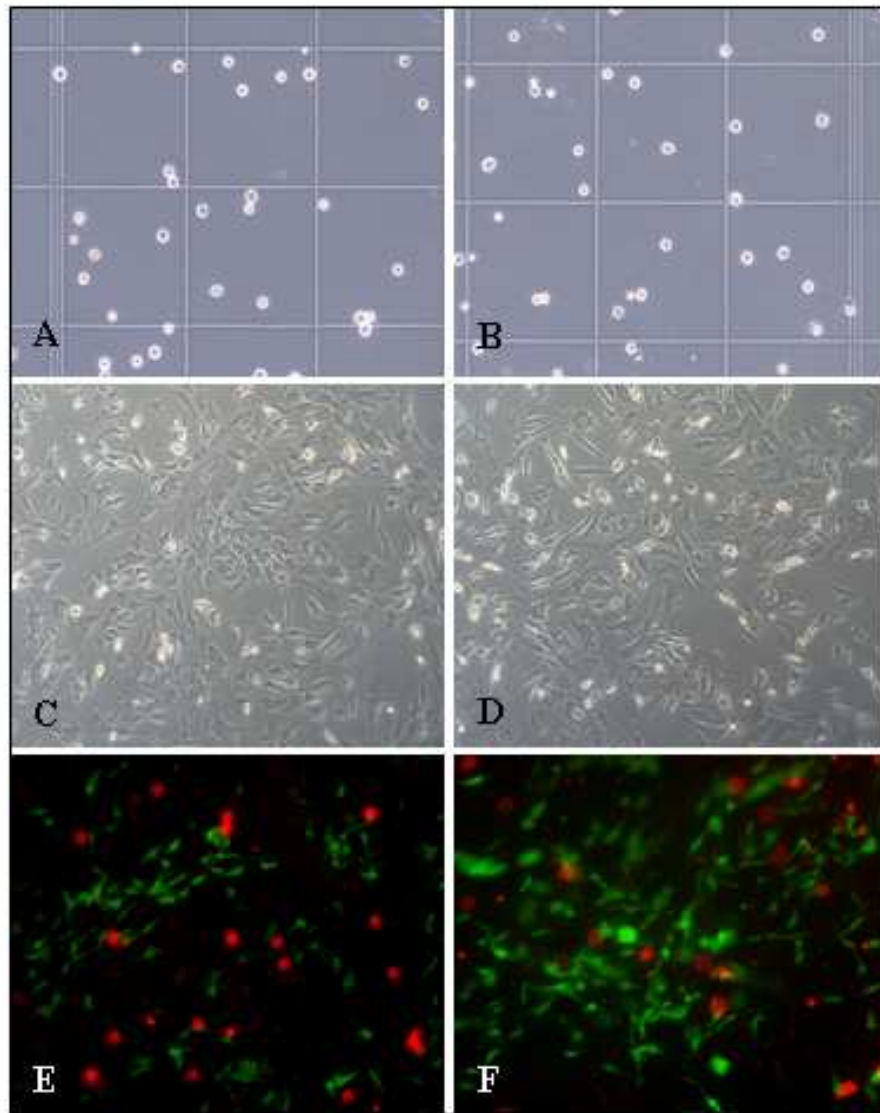


Abb. 9: Humane Chondrozyten nach Isolation in DMEM (A) oder MINI (B) sowie anschließender 2D-Kultur (DMEM-2D; C oder MINI-2D; D) oder 3D-Kultur (DMEM-3D; E oder MINI-3D; F) in DMEM. Alle Kulturmedien waren mit 5% HuS supplementiert. Zur genauen Bestimmung der Vitalität wurden die Chondrozyten im Kollagen-I-Gel mit einer "Lebend/Tod"-Färbung markiert (vital: grün; avital: rot). Originalvergrößerung: 10x10.

Während die frisch isolierten Chondrozyten eine runde Form aufwiesen, konnte nach deren Kultivierung sowohl in Monolayerkultur (2D) als auch im Kollagen-I-Gel (3D) die Ausprägung eine fibroblasten-ähnlichen Morphologie beobachtet werden.

Sowohl nach Isolation als auch nach Kultivierung der Zellen wurde deren Vitalität überprüft. Nach Isolation in DMEM (DMEM-Iso; A) und anschließender 2D-Kultur in DMEM (DMEM-2D; C) konnte eine Vitalität der Zellen von 95% beobachtet werden. Zellen nach Isolation in MINI (MINI-Iso; B) und anschließender 2D-Kultur in DMEM (MINI-2D; D) wiesen eine Vitalität von 80% auf. Zudem wies die Betrachtung der 2D-

Kultur nach MINI-Isolation oft auf eine geringere Zelldichte, als nach DMEM-Isolation, hin.

Mit einer "Lebend/Tod"-Färbung konnte die Vitalität der Chondrozyten im Kollagen-I-Gel bestimmt werden. Nach der 3D-Kultivierung, der in DMEM isolierten Zellen (DMEM-3D; E) und der in MINI isolierten Zellen, (MINI-3D; F) zeigte sich eine Vitalität von 90-95%.

Um den möglichen Einfluss des Isolationsmediums auf das Genexpressionsmuster der Chondrozyten nach Isolation und anschließender Kultivierung zu untersuchen, wurde die auf GAPDH normalisierte mRNA-Expression der Markergene Kol I, -II und -X sowie MMP-3 verglichen (Tab. 15).

Tab. 15: Übersicht der Genexpression humaner Chondrozyten in nativem Knorpelgewebe (NK), nach Isolation in DMEM oder MINI (DMEM-Iso, MINI-Iso) und anschließender 2D-Kultivierung (DMEM-2D, MINI-2D) oder 3D-Kultivierung (DMEM-3D, MINI-3D) in DMEM.

<i>Gen/GAPDH (Verhältnis Kopienzahl)</i>	<i>NK</i>	<i>DMEM- Iso</i>	<i>MINI- Iso</i>	<i>DMEM- 2D</i>	<i>MINI- 2D</i>	<i>DMEM- 3D</i>	<i>MINI- 3D</i>
Kol I	0,10 ± 0,09*	0,93 ± 0,63	0,91 ± 0,77	6,70 ± 2,62*	2,52 ± 1,21	0,70 ± 0,44	0,44 ± 0,32
Kol II	30,18 ± 15,73	20,68 ± 12,01	13,54 ± 5,37	2,26 ± 1,25*	2,99 ± 1,32	0,02 ± 0,02***	0,03 ± 0,02***
Kol X	0,05 ± 0,04*	0,32 ± 0,25	0,02 ± 0,01*	0,01 ± 0,00*	0,02 ± 0,01*	0,01 ± 0,00*	0,01 ± 0,01*
MMP-3	0,59 ± 0,30***	7,63 ± 3,08	8,40 ± 2,34	0,49 ± 0,19**	0,43 ± 0,23**	0,04 ± 0,02***	0,03 ± 0,01***

Alle Kulturmedien waren mit 5% HuS supplementiert. Die mRNA-Expression der Kollagene I, -II und -X sowie der MMP-3 wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die Daten sind auf GAPDH normalisiert und als Mittelwerte ± SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden, bezogen auf die Standardisolation (DMEM-Iso), mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt und sind mit folgenden Symbolen dargestellt * p≤ 0,05; ** p≤ 0,01; *** p≤ 0,001.

Ebenfalls wurde die mRNA-Expression dieser Markergene in nativem Knorpelgewebe (NK) ermittelt, um das Genexpressionprofil des Ausgangsmaterials abschätzen zu können und die Auswirkungen der Zellisolation und Kultivierung aufzuzeigen.

Signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression wurden auf die Standardisolation in DMEM (DMEM-Iso) bezogen.

Bei dem Vergleich des NK mit den Isolationen wurde deutlich, dass die Kol I-Expression in NK signifikant geringer ist. Die Erhöhung der Kol I-Expression der Chondrozyten nach der Isolierung in DMEM (DMEM-Iso) oder MINI (MINI-Iso) war vergleichbar. In NK konnte die höchste Kol II-Expression nachgewiesen werden, während die Chondrozytenisolation eine Abnahme der Kol II-Expression zur Folge hatte. Das auf diesen Ergebnissen basierende Kol II/I-Verhältnis war demnach im NK signifikant höher als in Zellen nach der Isolation (Abb. 10).

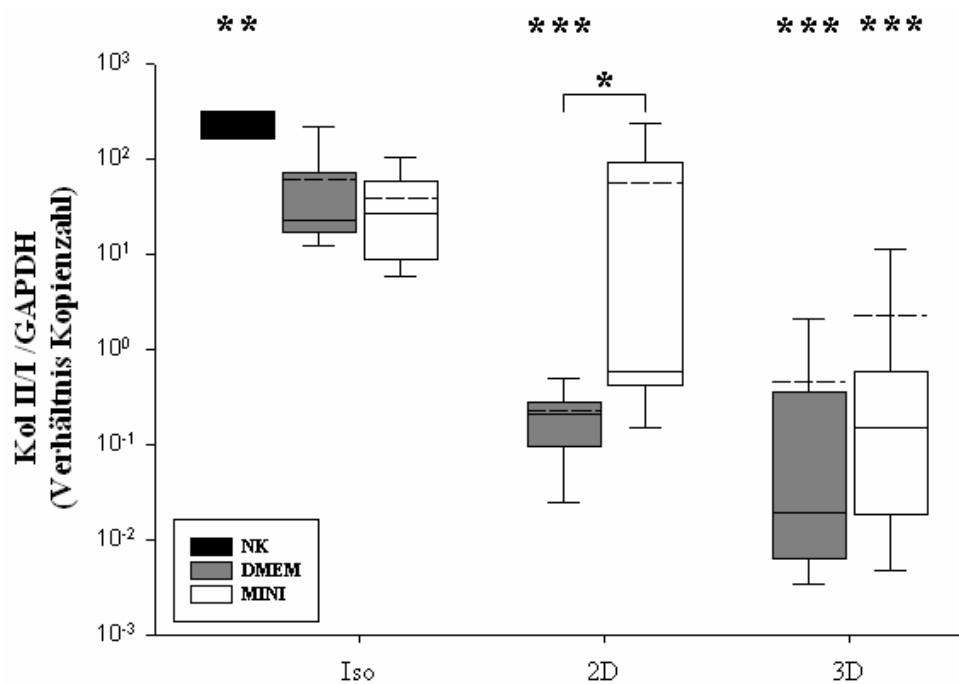


Abb. 10: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf das Kollagen II/I-Verhältnis humaner Chondrozyten nach Isolation (DMEM-Iso, MINI-Iso) und anschließender 2D-Kultivierung (DMEM-2D, MINI-2D) oder 3D-Kultivierung (DMEM-3D, MINI-3D) in DMEM. Alle Kulturmedien waren mit 5% HuS supplementiert. Zum Vergleich wurde das Kollagen II/I-Verhältnis in nativem Knorpelgewebe untersucht (NK). Die Daten sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (---). Signifikante Unterschiede wurden, bezogen auf die Standardisolation (DMEM-Iso) sowie innerhalb der Gruppe (Iso, 2D oder 3D), mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt und sind mit folgenden Symbolen dargestellt * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Zwischen DMEM-Iso und MINI-Iso konnten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Während bei Betrachtung des Mittelwertes das Kol II/I-Verhältnis in DMEM-Iso erhöht wirkte, zeigten die Median-Daten ein geringeres Kol II/I-Verhältnis in DMEM-Iso im Vergleich zu MINI-Iso.

DMEM-Iso zeigte eine starke Erhöhung der Kol X-Expression, wodurch diese in NK und MINI-Iso signifikant geringere Werte aufwies. In den Isolationen war eine stark

erhöhte MMP-3-Expression zu verzeichnen, welche in NK signifikant geringere Werte zeigte (Tab. 15).

Auffällig war die erhöhte Kol I- und geringere Kol II-Expression der Chondrozyten nach der 2D-Kultivierung. Dabei war die Kol I-Expression der in DMEM isolierten Zellen nach 2D-Kultur (DMEM-2D) signifikant höher und die Kol II-Expression signifikant geringer als in DMEM-Iso. Dadurch zeigte sich in DMEM-2D ein signifikant geringeres Kol II/I-Verhältnis als in DMEM-Iso (Abb. 10). Das Kol II/I-Verhältnis der in MINI isolierten Zellen nach 2D-Kultur (MINI-2D) war signifikant höher als in DMEM-2D. Weiterhin wiesen DMEM-2D und MINI-2D vergleichbar signifikant geringere Kol X- und MMP-3-Expressionen im Vergleich zu DMEM-Iso auf (Tab. 15).

Die Zellen der 3D-Kulturen zeigten, verglichen mit DMEM-Iso, geringere Kol I-Expressionen und signifikant geringere Kol II-Expressionen, wodurch sich das Kol II/I-Verhältnis als signifikant niedriger erwies (Abb. 11). Dies war allerdings in den in MINI isolierten Chondrozyten nach 3D-Kultur (MINI-3D) höher als in den in DMEM isolierten Chondrozyten nach 3D-Kultur (DMEM-3D). Die äußerst niedrigen Kol X- und MMP-3-Expressionen der Zellen nach den 3D-Kultivierungen waren signifikant geringer als in DMEM-Iso.

Die Auswertung der Genexpressionen der Chondrozyten, welche auf GAPDH normalisiert wurden, wiesen besonders nach der 3D-Kultivierung sehr geringe Werte auf (Tab. 15). Dies ist auf eine geringe Genexpression des Kol I, -II, -X und der MMP-3 zurückzuführen. Die absoluten GAPDH-Expressionen der Isolationen und Kulturen waren vergleichbar.

Um Aussagen über den möglichen Aufbau einer EZM der Chondrozyten in den Kulturen treffen zu können, wurde deren Proteoglykangehalt bestimmt (Tab.16).

Tab. 16: Übersicht des Proteoglykangehaltes (GAG/DNA), in DMEM oder MINI isolierter humaner Chondrozyten, nach 2D- oder 3D-Kultivierung.

	<i>DMEM-2D</i>	<i>MINI-2D</i>	<i>DMEM-3D</i>	<i>MINI-3D</i>
<i>GAG/DNA</i> ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	48.24 ± 3.31	41.82 ± 1.96	$8.56 \pm 3.9^{**}$	$4.44 \pm 1.13^{**}$

Die Daten wurden mittels eines DMB-Assays erhoben und sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe konnten mittels Mann-Whitney U-Test ausgeschlossen werden. Signifikante Unterschiede zwischen der 2D- und 3D-Kultur wurden mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt und mit folgendem Symbol dargestellt ** $p \leq 0,01$.

Nach der 2D-Kultivierung von beiden Isolationsvarianten (DMEM-2D, MINI-2D) konnte kein Unterschied im Proteoglykangehalt zwischen beiden Kulturen festgestellt werden. Ebenfalls bestand kein signifikanter Unterschied beider Kulturen nach der 3D-Kultivierung (DMEM-3D, MINI-3D).

Allerdings zeigte sich ein signifikant geringerer Proteoglykangehalt nach der 3D-Kultivierung gegenüber der 2D-Kultivierung.

Des Weiteren wurde durch die Bestimmung der AP-Aktivität der Status der Hypertrophie nach Isolation und anschließender Kulturen ermittelt (Abb. 11).

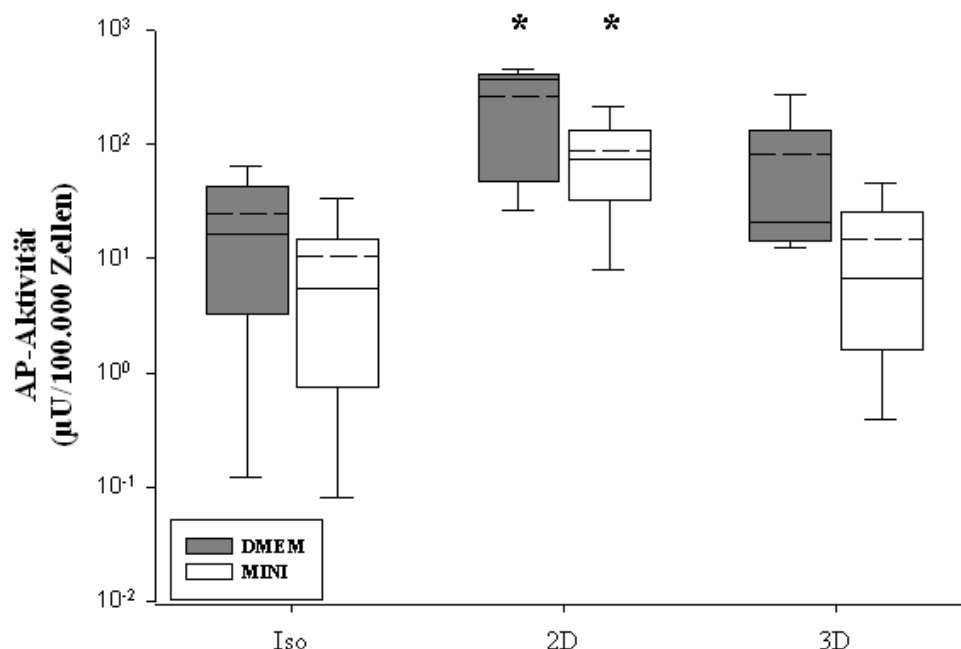


Abb. 11: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf die AP-Aktivität humaner Chondrozyten nach Isolation (DMEM-Iso, MINI-Iso) und anschließender 2D- oder 3D-Kultivierung in DMEM. Alle Kulturmedien waren mit 5% HuS supplementiert. Die Daten wurden mit Hilfe eines AP-Chemilumineszenztests ermittelt und sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —). Signifikante Unterschiede wurden, bezogen auf die Standardisolation (DMEM-Iso), mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt und sind mit folgendem Symbol dargestellt * $p \leq 0,05$. Innerhalb der Gruppe (Iso, 2D, 3D) konnten signifikante Unterschiede ausgeschlossen werden.

Die AP-Aktivität war nach der 2D- und 3D-Kultivierung der Zellen gesteigert, wobei sie nach der 2D-Kultivierung gegenüber der Standardisolation (DMEM-Iso) signifikant erhöht war.

Die in MINI isolierten Zellen wiesen direkt nach Isolation als auch nach 2D- oder 3D-Kultivierung eine geringere AP-Aktivität auf.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Isolation in MINI sowie deren nachfolgenden Kulturen in DMEM ein besseres Kol II/I-Verhältnis und eine geringere AP-Aktivität der Chondrozyten aufwiesen als nach Isolation in DMEM. Die Isolation in MINI hatte eine geringere Zellausbeute nach Isolation und nach anschließender 2D-Kultivierung zur Folge.

3.2.2 2D-Kultivierung nach 5 d

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden das Genexpressionsmuster sowie mögliche regulatorische Mechanismen während der 2D-Kultivierung untersucht. Hierbei wurde eine Kultivierungsdauer von 5 Tagen gewählt, damit die Chondrozyten adhärent und bereits Expansionseinflüssen ausgesetzt waren.

Das Genexpressionsprofil von DMEM-2D und MINI-2D wurde unter Verwendung eines Affymetrix-Chips sowie nachgeschalteter qRT-PCR ermittelt. Während mittels des Affymetrix-Chips je Verdaubedingung ein RNA-Pool von 6 Patienten untersucht wurde, konnten in den nachgeschalteten qRT-PCRs die einzelnen RNA-Proben der Patienten eingesetzt werden.

Die Daten der Affymetrix-Chip-Analyse ermöglichten Aussagen über die Expression knorpelspezifischer Gene wie Kollagene, Proteoglykane und MMPs.

Das mRNA-Expressionsverhältnis zwischen MINI-2D und DMEM-2D zeigte, dass 17 von 28 Kollagenen in MINI-2D niedriger exprimiert waren als in DMEM-2D (Tab.17).

Tab. 17: Übersicht der Kollagen-Genexpressionen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung der, in MINI oder DMEM isolierten, humanen Chondrozyten.

<i>Kollagene</i>	<i>Log₂ (MINI-2D/DMEM-2D)</i>
Kol IA1	-2,00
Kol I A2	-0,94
Kol IIA1	-0,29
Kol IIIA1	-1,56
Kol IVA1	-0,94
Kol IVA2	-1,22
Kol VA1	-0,34
Kol VA2	-0,27
Kol VA3	-1,15
Kol VIA1	-0,34
Kol VIA2	-0,20
Kol VIIIA1	-2,0
Kol IXA3	-2,00
Kol XIA2	-0,49
Kol XIVA1	-0,74
Kol XVA1	-0,86
Kol XVIA1	-0,54
Kol VIA3	0,61
Kol VIIA1	1,33
Kol VIIIA2	1,50
Kol IXA1	0,11
Kol IXA2	1,04
Kol XA1	0,29
Kol XIA1	0,91
Kol XIIA1	0,91
Kol XIII A1	0,95
Kol XXIA1	0,03
Kol XXVIIA1	0,57

Die mRNA-Expression der 28 Kollagene wurde unter Verwendung eines Affymetrix-Chips ermittelt, welcher die Analyse von 47.000 Genexpressionen ermöglichte. Die Daten wurden als Verhältnis der erhobenen Faktoren (Log₂ (MINI-2D/DMEM-2D)) dargestellt.

Dies betraf die Kol I- bis -VI-Expression, wobei Unterschiede in den verschiedenen Ketten zu verzeichnen waren. Beispielsweise war die Kol IA2-Expression doppelt so hoch wie die Kol IA1-Expression.

Diese Unterschiede bezüglich der Expression der verschiedenen Ketten waren ebenfalls in der Kol VIII- und Kol IX-Expression sichtbar. Die Kol I- und -II-Expressionen waren in MINI-2D geringer und die Kol X-Expression höher als in DMEM-2D.

Weiterhin konnte das Genexpressionsprofil der Proteoglykane mittels der Affymetrix-Chip-Analyse dargestellt werden (Abb. 12).

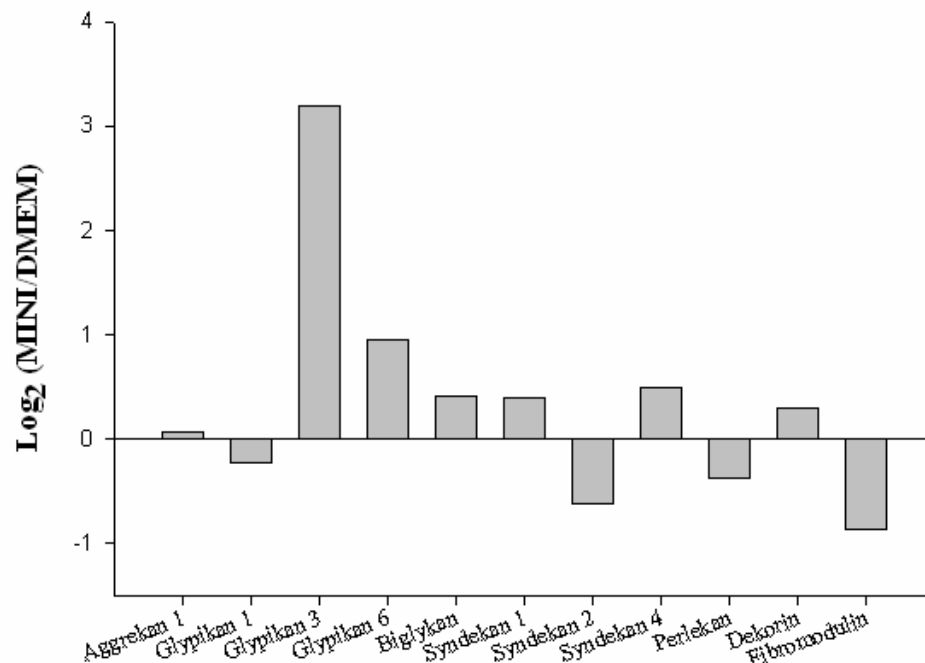


Abb. 12: Vergleich der Proteoglykan-Genexpressionen nach 5-tägiger 2D-Kultur von in DMEM oder MINI isolierten humanen Chondrozyten. Die mRNA-Expression der 11 Proteoglykane wurde unter Verwendung eines Affymetrix-Chips ermittelt, welcher die Analyse von 47.000 Genen ermöglichte. Die Daten wurden als Verhältnis der erhobenen Faktoren (Log_2 (MINI-2D/DMEM-2D)) dargestellt.

Durch die grafische Darstellung des MINI-2D/DMEM-2D-Verhältnisses konnte bei 7 von 11 untersuchten Proteoglykanen eine Erhöhung der mRNA-Expression in MINI-2D gezeigt werden. Dabei wies Glypikan 3 die höchste mRNA-Expression auf.

Bezüglich der MMP-Expressionen zeigten die Affymetrix-Chip-Daten, dass 3 von 7 MMPs in MINI-2D, im Vergleich zu DMEM-2D, erhöht waren (Abb. 13).

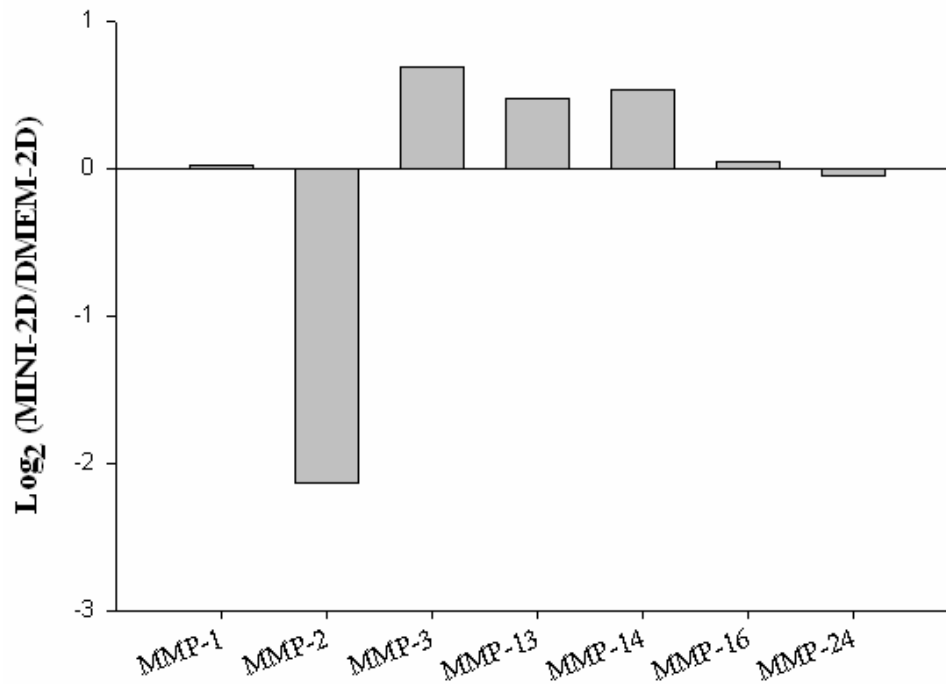


Abb. 13: Vergleich der MMP-Genexpressionen nach 5-tägiger 2D-Kultur von in DMEM oder MINI isolierten humanen Chondrozyten. Die mRNA-Expression der 7 MMPs wurde unter Verwendung eines Affymetrix-Chips ermittelt, welcher die Analyse von 47.000 Genen ermöglichte. Die Daten wurden als Verhältnis der erhobenen Faktoren (Log_2 (MINI-2D/DMEM-2D)) dargestellt.

Die Auswertung deutete auf eine erhöhte MMP-3-, -13- und -14-Expression sowie eine geringere MMP-2-Expression in MINI-2D hin (Abb. 15).

Die mRNA-Expressionen der MMP-1, -16 und -24 waren in beiden Kulturbedingungen vergleichbar.

Durch die nachfolgenden Überprüfungen der Chipdaten mittels qRT-PCR konnte eine geringere Kol I- und -II-Expression sowie ein etwas erhöhtes Kol II/I-Verhältnis in MINI-2D gegenüber DMEM-2D nachgewiesen werden (Abb. 14).

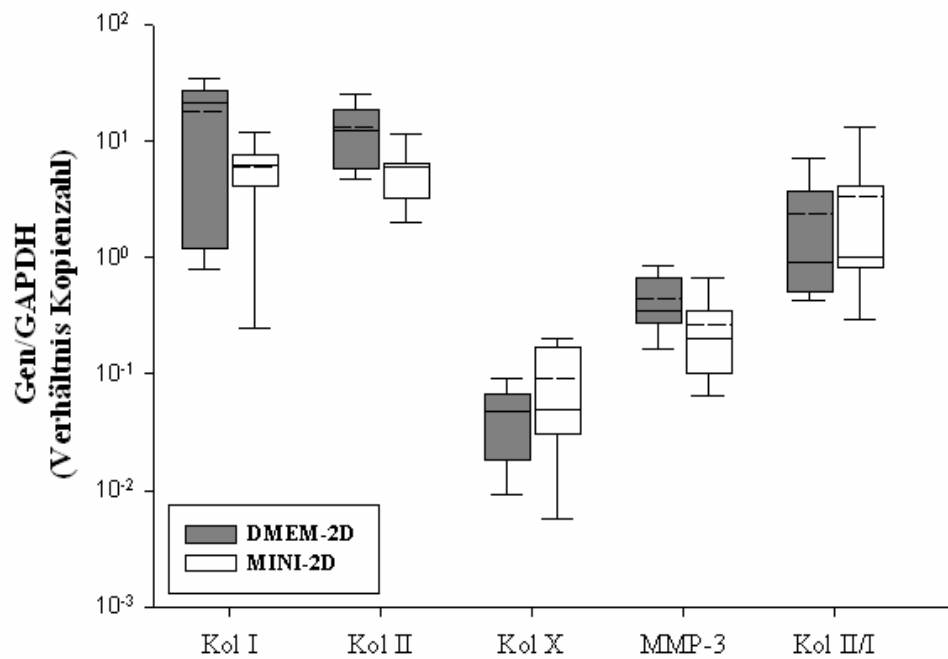


Abb. 14: Vergleich der Genexpressionen nach 5-tägiger 2D-Kultur von in DMEM oder MINI isolierten humanen Chondrozyten. Die mRNA-Expressionen der GAPDH, der Kollagene I, -II und -X sowie der MMP-3 wurden durch qRT-PCR ermittelt. Die Expressionsdaten der Kollagene und der MMP-3 wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —). Signifikante Unterschiede konnten mittels Mann-Whitney U-Test ausgeschlossen werden.

Weiterhin wiesen die Ergebnisse auf eine geringe Erhöhung der Kol X-Expression und eine geringere MMP-3-Expression in MINI-2D hin.

Auch auf Proteinebene konnte das Kol I und -II in DMEM-2D und MINI-2D nach 5-tägiger Kultivierung mittels Immunhistologie nachgewiesen werden (Abb. 15).

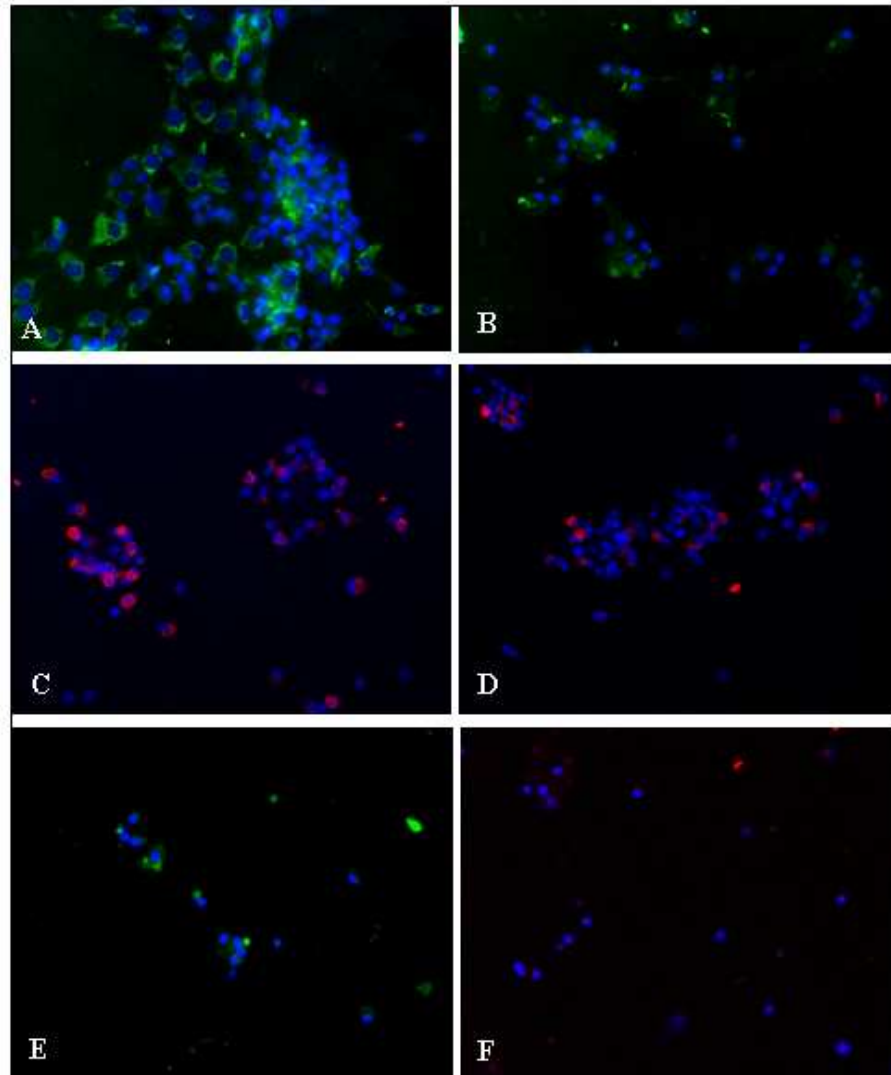


Abb. 15: Proteinnachweis der Kollagene I und -II von in DMEM oder MINI isolierten humanen Chondrozyten nach 5-tägiger 2D-Kultur (DMEM-2D, MINI-2D). Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte Kol I in DMEM-2D (A) und MINI-2D (B) sowie Kol II in DMEM-2D (C) und MINI-2D (D) nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Färbung (blau) detektiert. Für Kontrollfärbungen wurde nur der für die Kol I- und II-Färbung verwendete 2. Antikörper (Spezies: Maus) aufgetragen (E, F). Originalvergrößerung: 20x10.

Hierbei konnte in DMEM-2D geringfügig mehr Kol I als in MINI-2D detektiert werden (A, B). Die DAPI-Färbung wies allerdings auf eine geringere Zellzahl in MINI-2D hin. Zudem konnte wenig Kol II in beiden Kulturen (C, D) nachgewiesen werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten den Einfluss der Chondrozytenisolation in MINI direkt nach Isolation als auch nach anschließender Kultivierung.

Zur Untersuchung möglicher Mechanismen, welche den Einfluss der MINI-Isolation auf die kultivierten Chondrozyten regulieren, wurden die Affymetrix-Chip-Daten hinsichtlich exprimierter Gene von Signalwegen analysiert.

Diese zeigten vor allem Expressionen bezüglich der MAPK-Kaskade auf, wobei mRNA-Expressionen von 22 Genen detektiert werden konnten (Tab. 18).

Tab. 18: Übersicht der, der MAPK-Kaskade zugehörigen, Genexpressionen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung von in MINI oder DMEM isolierten humanen Chondrozyten.

<i>Gene der MAPK-Kaskade</i>	<i>Log₂ (MINI-2D/DMEM-2D)</i>
RRAS(Ras)	-0,34
Raf1	-0,82
MAP2K3 (MKK3)	-0,50
MAPK10 (JNK)	-0,81
MAPK14 (p38)	-0,41
ARAF(ARaf1)	0,61
PLCB3	0,55
HRAS(Ras)	0,43
KRAS(Ras)	1,24
BRAF (Raf)	0,88
MAP2K1 (MEK1)	0,28
MAP2K2 (MEK2)	0,31
MAPK1 (ERK)	1,7
MAPK3 (ERK)	0,38
MAP3K1 (MEKK1)	1,09
MAP3K2 (MEKK2)	0,70
MAP3K3 (MEKK3)	1,66
MAP3K12 (MUK)	1,72
MAP2K3 (MKK3)	0,64
MAP2K4 (MKK4)	0,49
MAP2K7 (MKK7)	2,37
JUN (c-Jun)	0,99

Die mRNA-Expression der 22 Gene wurde unter Verwendung eines Affymetrix-Chips ermittelt, welcher die Analyse von 47.000 Genexpressionen ermöglichte. Die Daten wurden als Verhältnis der erhobenen Faktoren (Log₂ (MINI-2D/DMEM-2D)) dargestellt.

Im Vergleich zu DMEM-2D konnten in MINI-2D 5 geringere und 17 leicht erhöhte mRNA-Expressionen von der MAPK-Kaskade zugehörigen Genen nachgewiesen werden. Auffällig waren hierbei die in MINI-2D geringeren RAF1- und MAPK10-Expressionen sowie die erhöhten KRAS-, MAPK1-, MAP3K3-, MAP3K12 und MAP2K7-Expressionen.

Die nachgewiesene Expression von Genen der MAPK-Kaskade nach der Kultivierung von Chondrozyten, gab Anlass für einen anschließenden Nachweis auf Proteinebene. Dabei wurden die MAP-Kinasen, welche die Hauptwege der MAPK-Kaskade präsentieren und bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurden (siehe Tab. 18), in DMEM-2D und MINI-2D von je 2 Patienten, untersucht. Zur Detektion einer Aktivierung dieser Proteine wurden deren phosphorylierte Form betrachtet (Abb. 16).

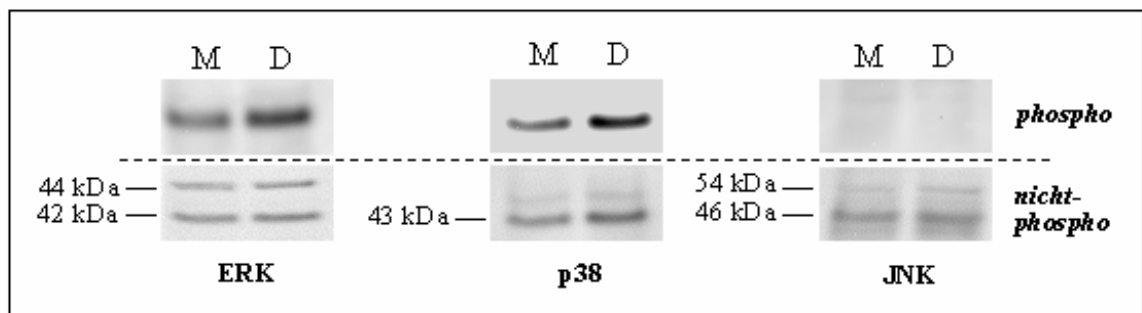


Abb. 16: Proteinnachweis mittels Western Blot von ERK, p38 und JNK sowie derer phosphorylierten Formen (phospho) nach 5-tägiger Expansion MINI-2D (M) und DMEM-2D (D).

Hierbei konnte eine vergleichbare Proteinmenge von ERK, p38 und JNK sowohl in MINI-2D als auch in DMEM-2D nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich teilweise Unterschiede auf der Aktivierungsebene. In DMEM-2D konnte eine etwas stärkere Aktivierung von ERK (phospho-ERK) und p38 (phospho) detektiert werden. Eine phospho-JNK-Proteinexpression war kaum zu verzeichnen, wodurch keine Aktivierung nachgewiesen werden konnte.

Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung möglicher Regulatoren bot der in der Literatur beschriebene mögliche Einfluss von HDACs auf die Genexpression von Chondrozyten [81]. Daher wurden die mRNA- und Protein-Expressionen sowie die enzymatische Aktivität der HDACs nach der 5-tägigen Kultivierung von in MINI oder DMEM isolierten Chondrozyten ermittelt.

Um Hinweise auf die Genexpression von HDACs zu erlangen, diente die weitere Analyse der Affymetrix-Chip-Daten. Dabei zeigte sich, dass die Genexpression von 7 HDACs nach der 5-tägigen 2D-Kultivierung detektiert wurde (Abb. 17).

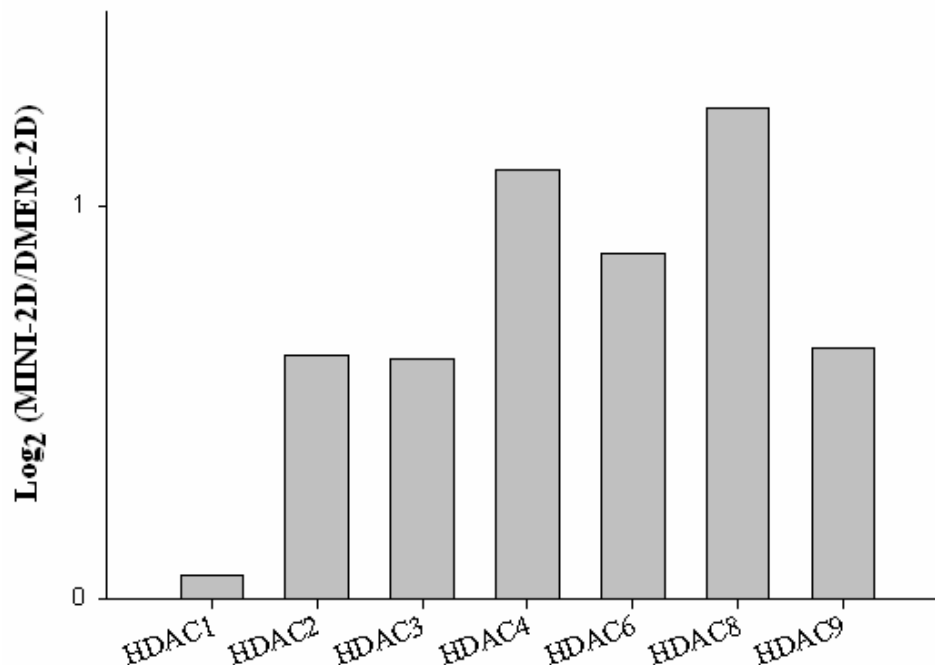


Abb. 17: Erhöhung der HDAC-Expression nach Isolation humaner Chondrozyten in MINI und anschließender 2D-Kultivierung in DMEM. Dargestellt ist das Verhältnis, nach 5-tägiger 2D-Kultivierung in DMEM, von in MINI (MINI-2D) und DMEM (DMEM-2D) isolierten Zellen.

Hierbei zeigte sich eine Erhöhung der HDAC1, -2-, -3-, -4-, -6-, -8- und -9-Expression in MINI-2D, gegenüber der HDAC-Expression in DMEM-2D. HDAC4 und -8 wiesen dabei die höchsten mRNA-Expressionen auf. Die HDAC1-Expression war hingegen in beiden Kulturen vergleichbar.

Die weitere Untersuchung der HDACs mittels qRT-PCR ließ auf eine Erhöhung der HDAC2, -4-, -6-, -8- und -9-Expression schließen (Abb. 18), wobei die mRNA-Expression der HDAC2 und -6 in MINI-2D gegenüber DMEM-2D signifikant erhöht war.

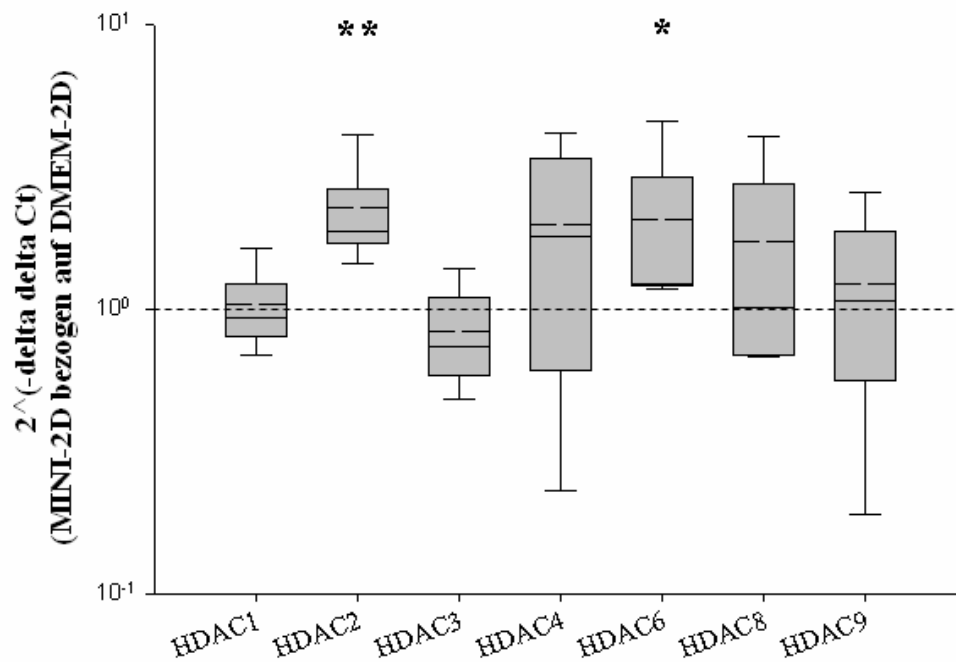


Abb. 18: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf die HDAC-Genexpressionen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung in DMEM. Die Expressionen der HDAC1, -2, -3, -4, -6, -8 und -9 wurden durch qRT-PCR ermittelt und als Verhältnis der delta delta Ct-Werte (auf GAPDH normalisiert) von ,in MINI isolierten (MINI-2D) sowie in DMEM isolierten (DMEM-2D), Chondrozyten nach 5-tägiger Kultivierung in DMEM berechnet. Die Daten sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —). Signifikante Unterschiede konnten mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt werden und sind mit folgenden Symbolen dargestellt * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Um Aussagen über die Kopienzahl der signifikant erhöhten HDAC2- und -6-Expression von DMEM-2D und MINI-2D treffen zu können, wurde eine qRT-PCR unter Verwendung von Standards durchgeführt (Abb. 19). Dadurch konnte die signifikant erhöhte Kopienzahl von HDAC2 und -6 in MINI-2D gegenüber DMEM-2D ermittelt werden.

Zudem zeigte sich, dass die HDAC-Kopienzahl im Verhältnis zur GAPDH-Kopienzahl nur geringfügig erhöht war. Dabei wies die HDAC6-Expression ein ca. 10-fach geringeres Verhältnis der Kopienzahl zu GAPDH auf als die der HDAC2.

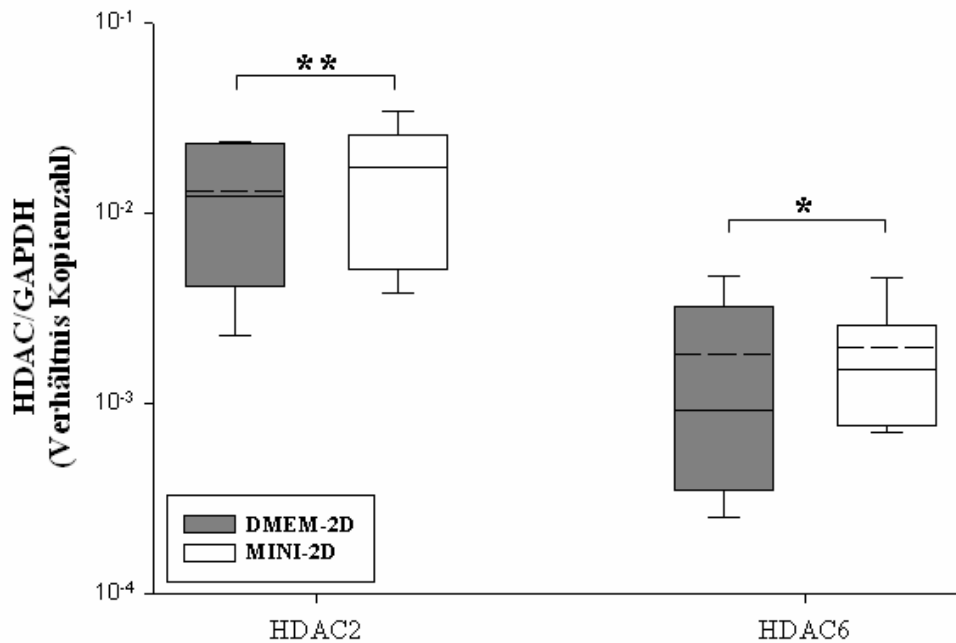


Abb. 19: Einfluss der Isolationsmedien DMEM und MINI auf die Kopienzahl der, nach Isolation in MINI und anschließender Kultivierung in DMEM (MINI-2D), signifikant erhöhten HDAC2- und -6-Expression. Die durch qRT-PCR ermittelten Daten wurden auf GAPDH normalisiert und sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —). Signifikante Unterschiede konnten mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt werden und sind mit folgenden Symbolen dargestellt * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

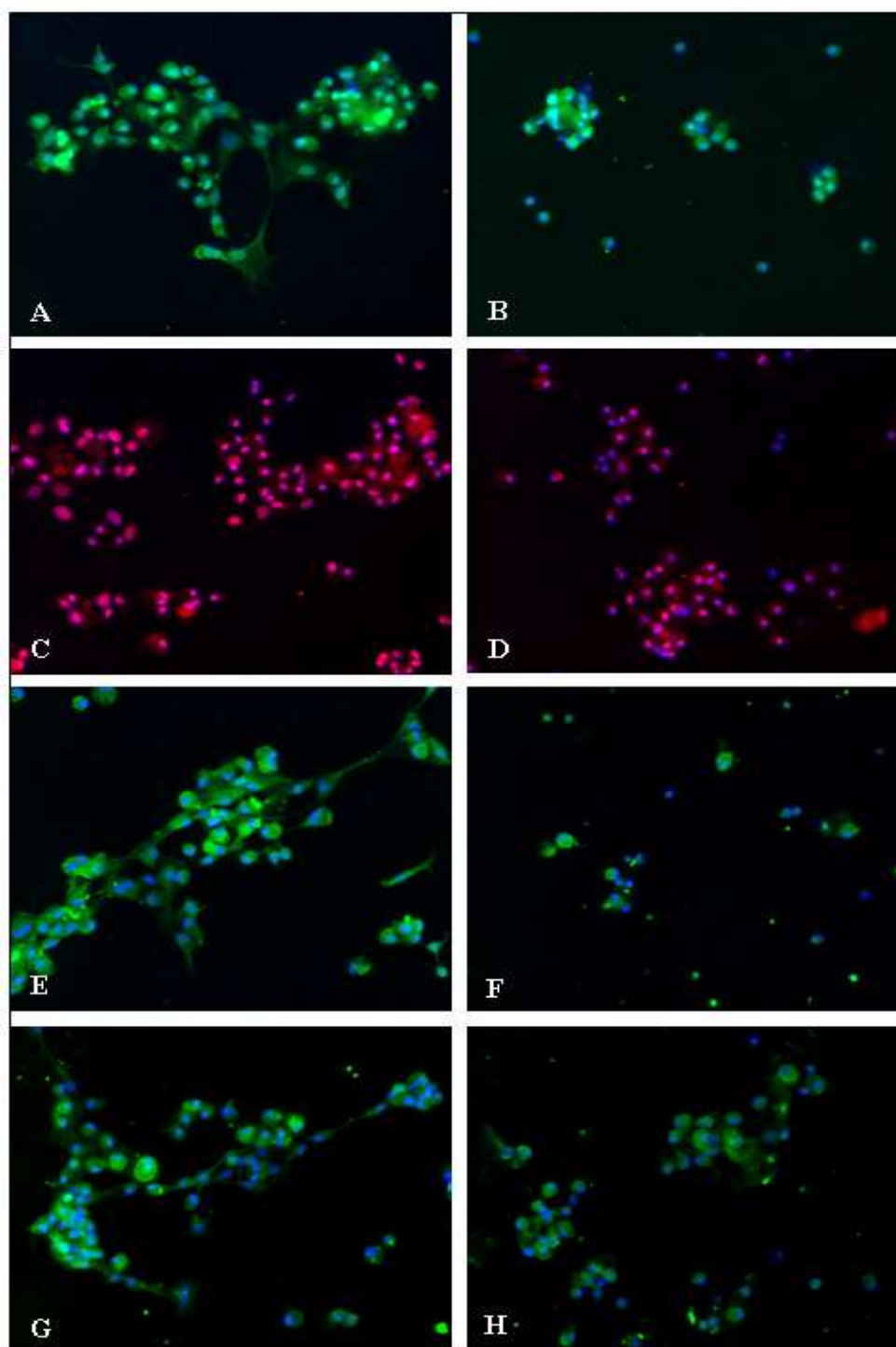
Um die HDACs nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene betrachten zu können, wurden diese immunhistologisch nach 5-tägiger Expansionskultur in DMEM-2D und MINI-2D nachgewiesen (Abb. 20).

HDAC1 konnte sowohl in DMEM-2D (A) als auch in MINI-2D (B) detektiert werden. Dabei zeigte sich eine Färbung des Zytoplasmas sowie des Zellkerns. Auffällig war die durch DAPI-Färbung erkennbar geringere Zellzahl in MINI-2D.

Die HDAC2-Färbung gelang in DMEM-2D (C) und MINI-2D (D), wobei diese vor allem die Zellkerne anfärbte und kaum im Zytoplasma zu erkennen war. MINI-2D wies dabei eine schwächere Färbung auf.

HDAC3 konnte sehr gut in DMEM-2D (E) und um einiges schwächer in MINI-2D (F) gezeigt werden. Hierbei fielen vor allem die Färbung des Zytoplasmas und deren Aussparung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf.

Die HDAC4-Färbung in DMEM-2D (G) und MINI-2D (H) konzentrierte sich auf das Zytoplasma und deren Intensität war in beiden Kulturen vergleichbar.



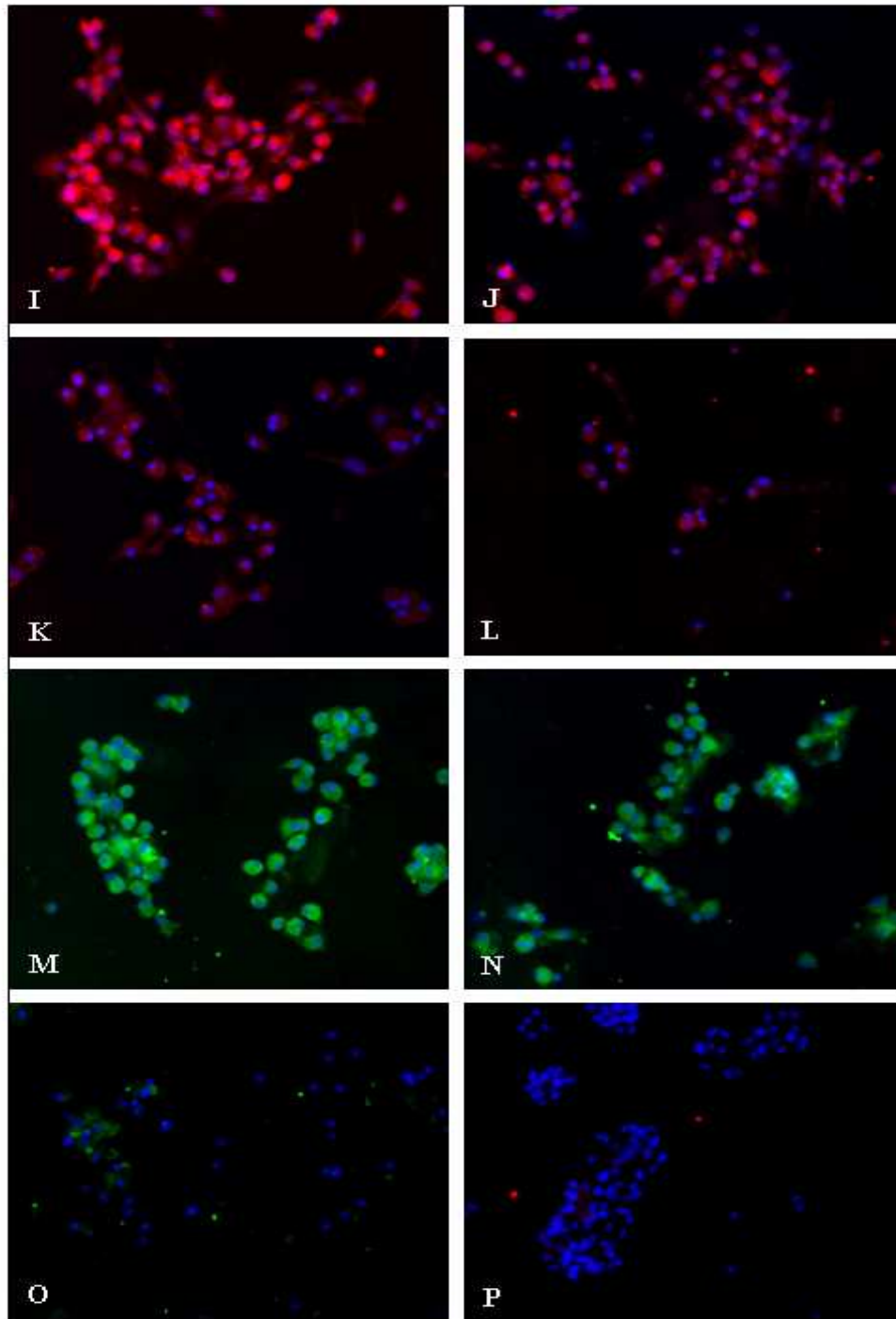


Abb. 20: Proteinnachweis der HDACs von in DMEM oder MINI isolierten humanen Chondrozyten nach 5-tägiger 2D-Kultivierung in DMEM (DMEM-2D, MINI-2D). Es wurden die HDAC1 (A, B), -2 (C, D), -3 (E, F), -4 (G, H), -6 (I, J), phosphorylierte HDAC6 (K, L) und HDAC8 (M, N) in DMEM-2D (linke Spalte) und MINI-2D (rechte Spalte) untersucht. Die Zellkerne konnten durch eine DAPI-Färbung (blau) detektiert werden. Für Kontrollfärbungen wurde nur der für die jeweilige HDAC-Färbung verwendete 2. Antikörper (Spezies: Kaninchen) aufgetragen (O, P). Originalvergrößerung: 20x10.

Die Färbung der HDAC6 war in DMEM-2D (I) intensiver als in MINI-2D (J) und im Zytoplasma lokalisiert.

Die phosphorylierte Form der HDAC6 (phospho-HDAC6) erschien hingegen schwächer und konnte ebenfalls in DMEM-2D (K) und MINI-2D (L) im Zytoplasma detektiert werden.

HDAC8 zeigte eine deutliche und vergleichbar Färbung im Zytoplasma von DMEM-2D (M) und MINI-2D (N).

Im Allgemeinen konnten HDAC1, -2, -3, -4, -6, phospho-6 und -8 in DMEM-2D als auch in MINI-2D nachgewiesen werden. Dabei waren die Färbungen der HDAC1, -3, -4, -6, phospho-6 und -8 im Zytoplasma und die Färbung der HDAC2 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.

Nach der Analyse der Genexpression und der Proteinnachweise der HDACs wurde ein HDAC-Aktivitätsassay durchgeführt (Abb. 21). Dabei wurde DMEM-2D und MINI-2D von je 6 Patienten untersucht.

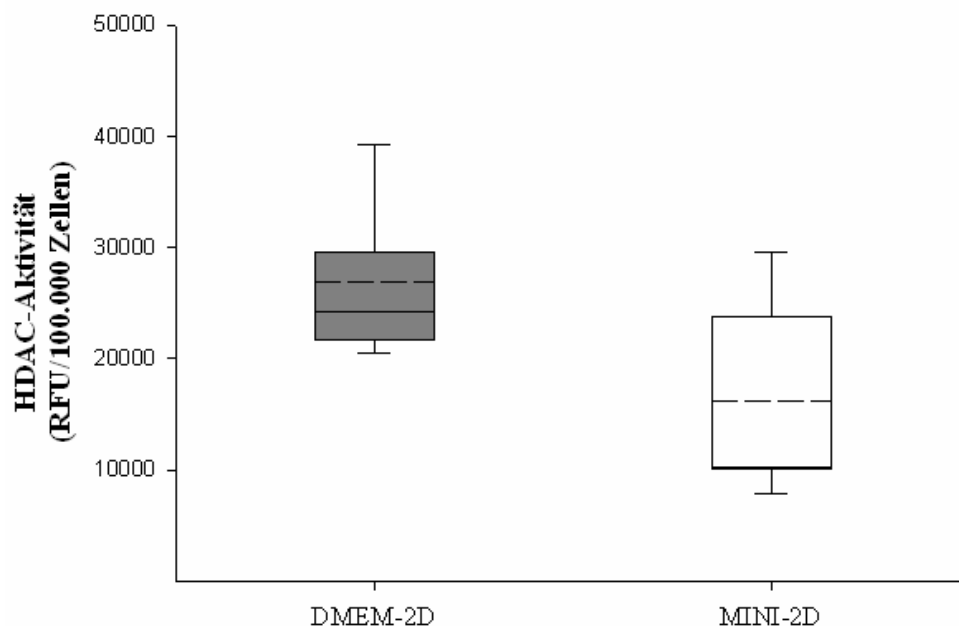


Abb. 21: Fluorimetrische Bestimmung der HDAC-Aktivität (RFU/100.000 Zellen) nach 5-tägiger 2D-Kultivierung von, in DMEM oder MINI isolierten, humanen Chondrozyten (DMEM-2D, MINI-2D). Die Daten sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —). Signifikante Unterschiede konnten mittels Mann-Whitney U-Test ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der HDAC-Aktivität nach 5-tägiger 2D-Kultivierung wies eine geringere Aktivität in MINI-2D auf, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kulturen ermittelt werden konnte.

Zusammenfassend wirkte sich die nährstoffarme Isolation nach 5-tägiger 2D-Kultivierung auf die Kollagen-, MMP-3- und Proteoglykan-Expression aus. Des Weiteren wies die Affymetrix-Chip-Analyse auf eine Beteiligung der MAPK-Kaskade hin, wobei anschließend eine etwas stärkere Aktivierung von ERK und p38 in DMEM-2D, verglichen zu MINI-2D, detektiert wurde.

Durch die Affymetrix-Chip-Analyse und nachfolgende Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene sind die HDACs in den Mittelpunkt der Betrachtung gerückt. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der HDAC2- und -6-Expression in MINI-2D im Vergleich zu DMEM-2D festgestellt werden.

3.3 HDAC-Profil im Knorpelgewebe

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse bezüglich der HDAC-Expression in kultivierten Chondrozyten war die Erstellung eines HDAC-Profils in Knorpelgeweben von Interesse. Dafür wurde die Genexpression von HDACs in Normalknorpelgewebe (N) und Knorpelgeweben von Osteoarthrose-Patienten (OA) untersucht und verglichen.

Im Normalknorpelgewebe konnte die Expression von 10 der 11 untersuchten HDACs detektiert werden (Abb. 22).

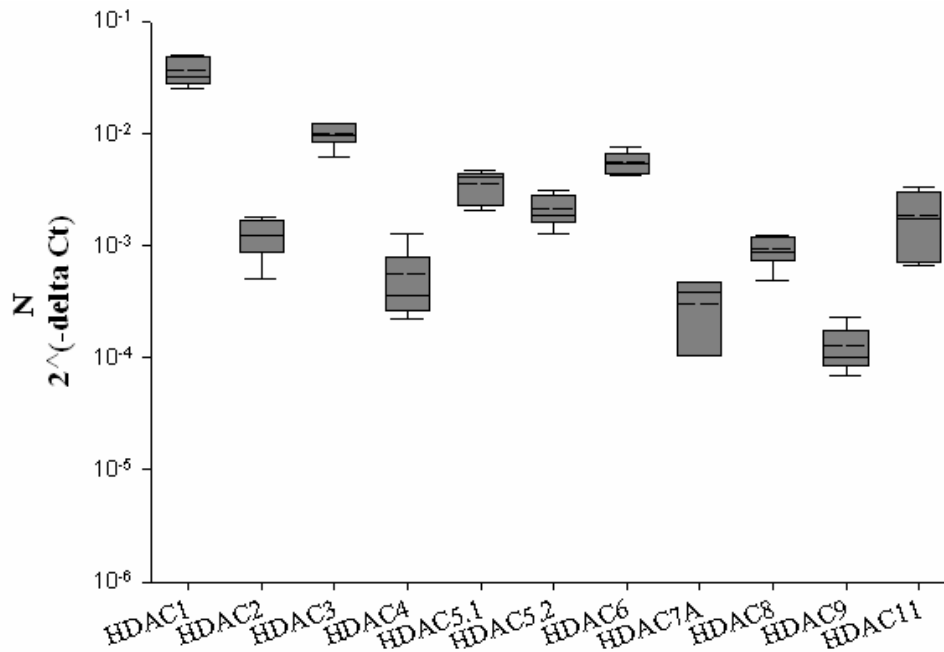


Abb. 22: Charakterisierung der mRNA-Expressionen der HDACs in normalen Knorpelgeweben (N). Die durch qRT-PCR ermittelten Daten wurden als delta Ct (normalisiert auf GAPDH) berechnet und sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —).

Eine mRNA-Expression der HDAC10 konnte nicht ermittelt werden. Zum Nachweis verschiedener Transkriptvarianten der HDAC5, wurden zwei Primerpaare (5.1, 5.2) verwendet.

Die HDAC1, -3 und -6 wiesen die höchsten mRNA-Expressionen auf.

Weiterhin zeigten die HDAC7 und -9 sehr geringe mRNA-Expressionen, wobei nur in 3 von 5 Patienten eine HDAC7-Expression detektiert werden konnte.

Im OA-Knorpelgewebe konnte die Expression von 10 der 11 untersuchten HDACs detektiert werden (Abb. 23), wobei keine HDAC10-Expression ermittelt wurde.

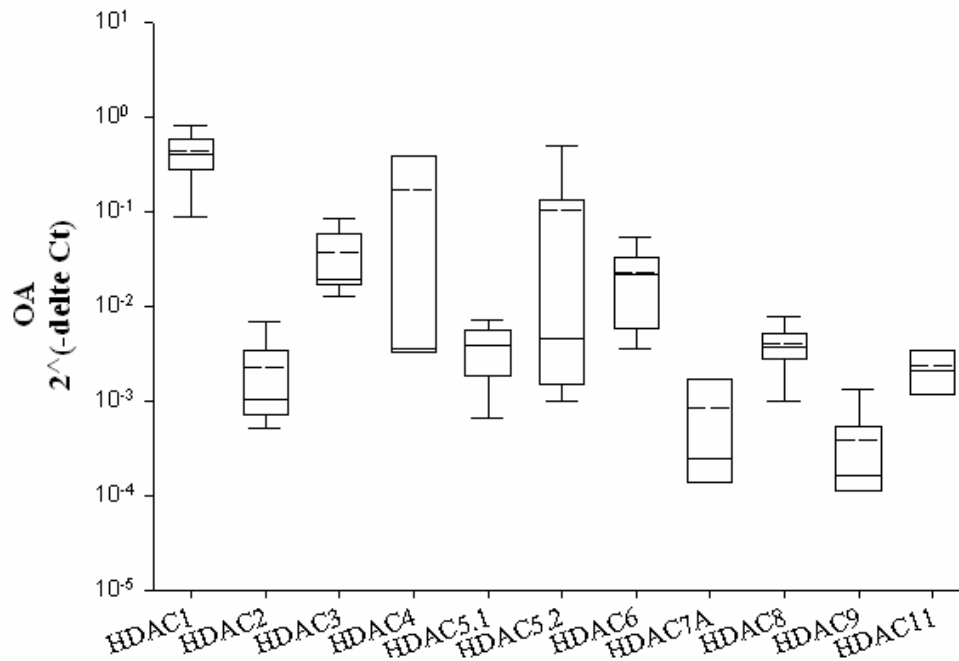


Abb. 23: Charakterisierung der mRNA-Expressionen der HDACs in osteoarthrotischen Knorpelgeweben (OA). Die durch qRT-PCR ermittelten Daten wurden als delta Ct (normalisiert auf GAPDH) berechnet und sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (---).

Zum Nachweis verschiedener Transkriptvarianten der HDAC5, wurden zwei Primerpaare (5.1, 5.2) verwendet.

Die HDAC1 und -3 wiesen die höchste mRNA-Expression auf. Die Genexpression der HDAC7 und -9 war im Vergleich der anderen HDAC-Expressionen sehr gering.

Auffällig war, dass nur in 3 von 5 Patienten eine HDAC4- und -7-Expression nachgewiesen werden konnte.

Zum weiteren Vergleich der HDACs in beiden Knorpelgeweben wurde deren Kopienzahl unter Verwendung von Standards in der qRT-PCR ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass die HDAC1- und -3-Expression im OA-Knorpelgewebe, verglichen mit Normalknorpelgewebe, signifikant erhöht ist (Abb.24).

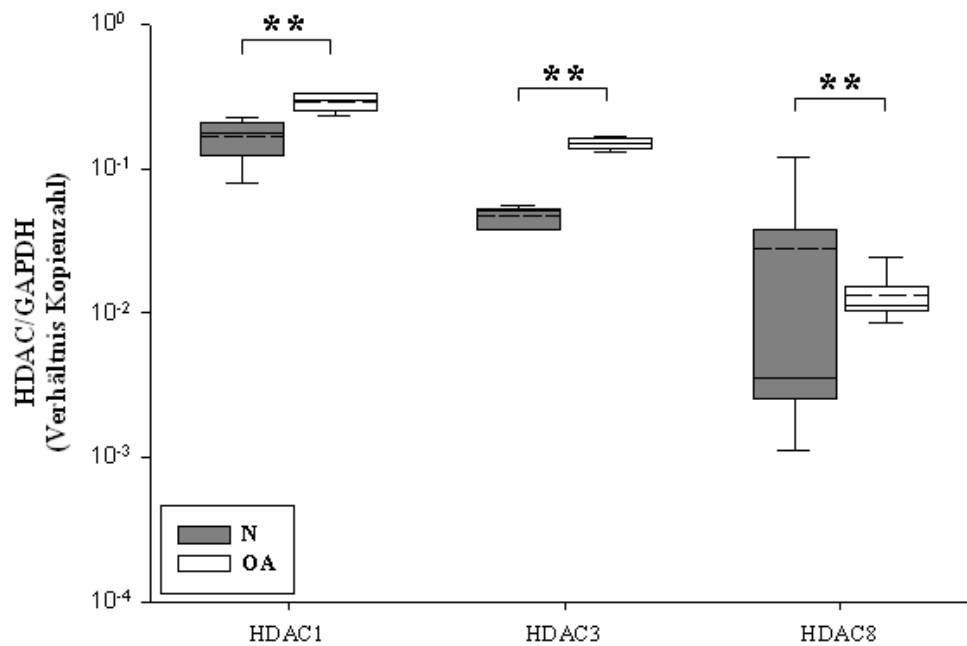


Abb. 24: Charakterisierung der signifikant unterschiedlichen HDAC-Expressionen zwischen Normal- (N) und osteoarthrotischen Knorpelgeweben (OA). Die Daten zeigen das Verhältnis der Kopienzahl (normalisiert auf GAPDH) und sind als Box Plots (5%, 25%, 75% und 95% Perzentile) dargestellt. Angegeben sind der Median (—) und der Mittelwert (— —). Signifikante Unterschiede konnten mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt werden und sind mit folgenden Symbolen dargestellt ** $p \leq 0,01$.

Die HDAC8-Expression war im OA-Knorpelgewebe signifikant erhöht, auch wenn diese aufgrund der großen Streuung im Normalknorpelgewebe einen höheren Mittelwert erzielte.

Da im OA-Knorpelgewebe nur 3 von 5 Patienten eine HDAC4-Expression aufwiesen, wurde diese mittels PCR in Normal- und OA-Knorpelgewebe von je 10 Patienten untersucht. Als cDNA- und PCR-Kontrolle wurde ebenfalls eine GAPDH-PCR durchgeführt (Abb. 25).

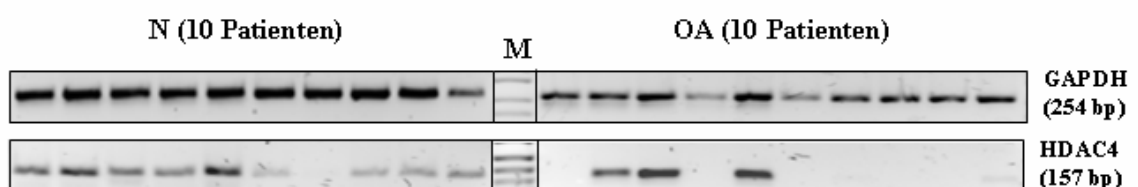


Abb. 25: Untersuchung der mRNA-Expression von GAPDH und HDAC4 in Normal- (N) und osteoarthrotischen (OA) Knorpelgeweben mittels PCR von jeweils 10 Patienten. Als DNA-Marker (M) wurde pUC 19/MSP aufgetragen.

In 9 von 10 Normalknorpelgeweben konnte eine HDAC4-Expression nachgewiesen werden. Hingegen konnte in nur 3 von 10 OA-Knorpelgeweben eine HDAC4-Expression detektiert werden.

Da im OA-Knorpelgewebe nur 3 von 5 Patienten eine HDAC7-Expression aufwiesen und diese in beiden Gewebetypen nur schwach exprimiert war, wurde diese in einer nachgeschalteten PCR untersucht. Weder im Normal- noch im OA-Knorpelgewebe konnte eine HDAC10-Expression mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Deshalb wurden diese ebenfalls in einer zusätzlichen PCR untersucht (Abb. 26).

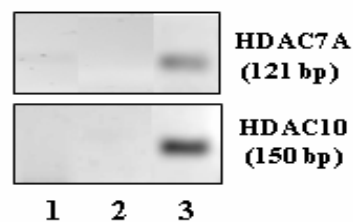


Abb. 26: Untersuchung der mRNA-Expression von HDAC7A und HDAC10 in Normal- (1) und osteoarthrotischem (2) Knorpelgewebe mittels PCR. Dargestellt ist je eine Probe von insgesamt 5 Patienten pro Knorpelgewebetyp. Zur Kontrolle der Primer wurde zusätzlich eine HDAC7A- und -10-PCR unter Verwendung der cDNA von primären Tubulusepithelzellen (3) durchgeführt.

Dies zeigte in allen Proben eine sehr schwache HDAC7-Expression im Normalknorpelgewebe (1) sowie meist eine fehlende HDAC7-Expression im OA-Knorpelgewebe (2). Außerdem konnte in beiden Geweben keine HDAC10-Expression detektiert werden.

Zur Überprüfung der verwendeten HDAC7 und -10 Primerpaare wurden diese zum HDAC-Expressionsnachweis in primären Tubulusepithelzellen eingesetzt (3).

Dabei konnten PCR-Produkte der HDAC7 und -10 nachgewiesen werden.

Der Vergleich der HDAC-Genexpressionen zeigte eine signifikante Erhöhung der HDAC1-, -3- und -8-Expression in OA-Knorpelgeweben gegenüber Normalknorpelgeweben. Weiterhin konnte nur in wenigen OA-Knorpelgeweben eine HDAC4- und -7-Expression detektiert werden. Sowohl in Normalknorpel- als auch in OA-Knorpelgeweben konnte keine HDAC10-Expression nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Im Rahmen des Tissue Engineerings wurden in den letzten Jahrzehnten viel versprechende Techniken zur Behandlung von Knorpeldefekten entwickelt. Durch den Einsatz der ACT konnten dabei Knorpeldefekte unter Verwendung autologer Chondrozyten behandelt werden. Um diese Verfahren zukünftig für die Behandlung degenerativer Knorpelerkrankungen wie Osteoarthritis zugänglich zu machen, bedarf es Techniken, wodurch großflächige Knorpeldefekte geschlossen werden können. Dabei spielt vor allem das Expansions- und Redifferenzierungspotenzial der autologen Chondrozyten eine wichtige Rolle [95]. Die Behandlung von Knorpeldefekten erfordert, je nach angewandeter Technik, meist hohe Zellzahlen. Dieser Notwendigkeit steht jedoch die, mit der Gewinnung autologer Chondrozyten einhergehende, Limitierung der Zellausbeute gegenüber. Deshalb werden zur Bereitstellung höherer Zellzahlen die autologen Chondrozyten meist in Monolayer (2D-Kultur) expandiert, wodurch jedoch eine Dedifferenzierung der Zellen stattfindet [51, 60]. Um eine Reduktion der Dedifferenzierung und Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps zu begünstigen wurden Konstrukte zur 3D-Kultivierung der Zellen entwickelt [56, 96].

Laut Literaturangaben wurden die 2D- und 3D-Kultivierungen von Chondrozyten bereits extensiv untersucht. Der Einfluss einer Chondrozytenisolation auf deren Dedifferenzierung wurde jedoch bisher weitestgehend außer Acht gelassen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand deshalb die Untersuchung des Einflusses verschiedener Isolationsmedien (DMEM und MINI) auf humane Chondrozyten nach Isolation aus arthrotisch vorgeschädigtem Knorpelgewebe sowie anschließender 2D- oder 3D-Kultivierung.

4.1 Probenmaterial

Der für die Experimente verwendete artikuläre Humanknorpel stammte von Patienten im Alter von 53 - 82 Jahren (Altersdurchschnitt: 75 Jahre), die sich aufgrund einer OA einer Totalendoprotheseoperation unterzogen. Die Gewebsentnahme von den, im Rahmen des Eingriffs, anfallenden Knorpel-Knochen-Resektaten wurde hauptsächlich im Bereich der Femurkondylen vorgenommen. Durch die Auswertung der klinischen Daten konnten sekundäre Osteoarthrosen und entzündliche Erkrankungen ausgeschlossen werden. Da bereits in intakt wirkenden Knorpelbereichen solcher

Resektate geringe arthrotische Veränderungen aufgezeigt werden konnten [97], wurde sich in dieser Arbeit hauptsächlich auf die makroskopisch unversehrten, hyalinen Anteile des bestehenden Restknorpels beschränkt.

Trotz dieser sorgfältigen Auswahl der Knorpelproben hat die Verwendung von Humanmaterial eine interindividuelle Varianz [98, 99] zur Folge, welche für die Untersuchungen in Kauf genommen werden musste. Diese Problematik erklärt die zum Teil großen Streuungen der Ergebnisse, welche zur Absicherung einer statistischen Auswertung unterzogen wurden.

4.2 Isolationsmedien

Im Rahmen der ACT werden die Chondrozyten durch einen Verdau, der sie umgebenden Matrix, gewonnen. Dass diese enzymatische Isolation einen Einfluss auf die Zellausbeute und das Genexpressionsprofil der Chondrozyten ausübt, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [61-63]. Meist ist die Gewinnung einer hohen Zellzahl von Chondrozyten für die spätere Behandlungsmöglichkeit von Knorpeldefekten notwendig. Durch die Verwendung verschiedener Isolationsenzyme und -zeiten konnten unterschiedliche Zellausbeuten erzielt werden. Da die Chondrozyten während der Isolation einem hohen Stress ausgesetzt sind, spielt jedoch nicht nur die Zellausbeute, sondern auch die Beeinflussung des Genexpressionsprofils der Chondrozyten eine wichtige Rolle. Längere Isolationszeiten wiesen höhere Zellausbeuten, aber auch signifikante Veränderungen in der Genexpression nach anschließender Kultivierung der Chondrozyten, im Vergleich zu nativem Knorpelgewebe, auf [63]. Die Kultivierung isolierter Chondrozyten stellte eine viel genutzte Möglichkeit zur Expansion, also zur Erhöhung der Zellzahl, für die Behandlung von Knorpeldefekten dar. Jedoch wird durch die Kultivierung nicht nur eine Proliferation, sondern auch eine Dedifferenzierung der Chondrozyten erzielt.

Zur Beeinflussung der Dedifferenzierung bzw. des Genexpressionsprofils in Richtung chondrozytären Phänotyp wird häufig die Chondrozytenkultivierung, unter Zusatz regulatorisch wirksamer Mediatoren, genutzt [67, 100, 101]. In dieser Arbeit standen hingegen die Chondrozytenisolation und deren Auswirkung auf die weitere Kultivierung im Fokus.

In dieser Arbeit wurden die Chondrozyten durch einen 22-stündigen Pronase/Kollagenase-Verdau isoliert. Um den Isolationseinfluss auf die Genexpression der Chondrozyten zu mindern, wurde die Zusammensetzung des Isolationsmediums variiert. Dabei wurde, in Adaption an das niedrige Substratangebot im Knorpelgewebe [9], der Glukose- bzw. Nährstoffgehalt reduziert.

Zur Untersuchung möglicher Effekte durch eine nährstoffarme, an *in vivo* angepasste, Isolation wurden die Chondrozyten im so genannten MINI und zum Vergleich im Standardisolationsmedium DMEM isoliert. Da ausschließlich der Isolationprozess verändert wurde, fanden die anschließenden 2D- und 3D-Kultivierungen der Chondrozyten in DMEM statt.

Durch den Einsatz des 22h-stündigen Pronase/Kollagenase-Verdau sollte eine ausreichende Zellausbeute erzielt werden. Die Verwendung des nährstoffarmen Isolationsmediums sollte den bereits beschriebenen Isolationseinfluss auf die chondrozytäre Genexpression mindern.

4.3 Chondrozytenisolation und -expansion unter Zusatz von FKS oder HuS

Zur Charakterisierung von humanen Chondrozyten greifen viele Arbeitsgruppen auf den universell eingesetzten Mediumzusatz FKS während der Isolation als auch Kultivierung zurück [61, 62, 102, 103].

In Anlehnung an die ACT, bei welcher die Isolation und Kultivierung unter Zusatz von humanem, autologen Serum durchgeführt wird, stellte sich in dieser Arbeit die Frage nach dem Einsatz von HuS.

Um den Einfluss beider Seren untersuchen und vergleichen zu können, wurden FKS bzw. HuS als Mediumzusatz während der Chondrozytenisolation und anschließender Kultivierung verwendet.

Die Gewinnung des verwendeten HuS erfolgte durch Zentrifugation des Blutes von ca. 400 Patienten. Das Serum wurde anschließend gepoolt und hitzeinaktiviert. Zur Vermeidung lipämischer Stoffe, Filterung von Steroiden und möglicher Medikamente wurde der Serumpool durch eine Aktivkohlebehandlung gereinigt [104-106].

Zum direkten Vergleich dieses HuS und kommerziell erhältlichem FKS erfolgte eine Analyse der Glucose-, Insulin-, IGF-1-, PTH- und Östradiol-Konzentrationen. Dabei wies das HuS meist höhere Konzentrationen dieser Parameter auf. Da dem Medium nur 5% Serum zugesetzt wurden war beispielsweise die Glucose-Konzentration im Medium

unter Zusatz von HuS nur 1,19-fach, gegenüber dem Medium unter Zusatz von FKS, erhöht. Somit konnten die Konzentrationsunterschiede der Seren vernachlässigt werden. Zur Abschätzung möglicher Isolationseinflüsse wurden direkt nach Chondrozytenisolation die Zellausbeute sowie das Genexpressionsprofil ermittelt.

Während die Supplementierung von FKS oder HuS vergleichbare Zellausbeuten nach DMEM- und MINI-Isolation zur Folge hatte, zeigte sich durch den Zusatz von FKS eine stärkere Reduktion der gesamten mRNA-Expression der Chondrozyten nach der nährstoffarmen Isolation in MINI.

Die 14-tägige Kultivierung von Chondrozyten in DMEM unter Zusatz von FKS oder HuS wies keine morphologischen Unterschiede auf, allerdings konnte unter Zusatz von 5% HuS eine signifikant erhöhte Proliferationsrate (2,4-fach) verzeichnet werden. Dieses Ergebnis wird durch Literaturangaben gestützt, in welchen die Verwendung von 10 % HuS in der Expansion, eine 3- bis teilweise 5-fache Erhöhung der Zellzahl, gegenüber der Expansion unter Verwendung von FKS aufwies [107-109].

Im Vergleich zum HuS-Zusatz erzielte der Zusatz von FKS einen höheren Proteoglykangehalt (1,6-fach) in der Chondrozytenkultur. Die Genexpression des Kol I, als Dedifferenzierungsmarker, und II, als Differenzierungsmarker der Chondrozyten waren nach beiden Kulturen vergleichbar. Diesen Sachverhalt konnte auch die Arbeitsgruppe um Munirah *et al.* durch ihren Vergleich von Chondrozytenexpansionen mit autologem und gepoolten HuS sowie mit FKS beobachten [108].

Die signifikant geringere Expression des Kol X (2-fach), als Hypertrophiemarker, und der MMP-3 (3,6-fach), als kataboler Marker, der Zellen der HuS-Expansion könnte einen Hinweis auf verbesserte Kulturbedingungen unter Zusatz von HuS statt FKS liefern. Allerdings muss eingeräumt werden, dass die Kol X- und MMP-3-Expression nach beiden Kulturen sehr niedrige Expressionsraten aufwiesen.

Die Ergebnisse des Serumvergleichs während der Isolation und Kultivierung zeigten, dass das gepoolte HuS als Zusatz für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden konnte.

Die Verwendung von FKS in der Isolation und Kultivierung humaner Chondrozyten ist ein viel diskutiertes Thema. Hierbei stellt sich, in Anbetracht auf eine klinische Anwendung die Frage nach dem Übertragungsrisiko von Virus- und Prionen-Infektionen auf den Patienten [110]. Aufgrund der besseren Proliferation in der Expansionskultur und der Risikominderung von Krankheitsübertragung auf den Patienten wird die Verwendung von autologem HuS als Mediumzusatz klar favorisiert

[107-109, 111]. Diese Proliferationsvorteile gegenüber dem FKS-Zusatz konnten auch bei der Verwendung von gepooltem HuS beobachtet werden [108, 112].

Diese Literaturangaben und die Ergebnisse des Serumvergleiches dieser Arbeit untermauern den Einsatz von gepooltem HuS für die nachfolgenden Experimente.

4.4 Einfluss der Isolationsmedien auf die Chondrozytenisolation und anschließende Kulturen

Zur Untersuchung möglicher Einflüsse der nährstoffarmen Isolation in MINI und deren Auswirkungen in Kultur wurden die Chondrozytenisolationen in DMEM oder MINI sowie deren nachfolgenden 2D- oder 3D-Kultivierungen in DMEM miteinander verglichen. Die Charakterisierung erfolgte in Bezug auf die Zellausbeute, Morphologie und Vitalität, Genexpression, den Proteoglykangehalt sowie die AP-Aktivität.

Die dabei erhaltenen Zellzahlen wiesen auf bessere Zellausbeuten nach der Chondrozytenisolation in DMEM sowie den nachfolgenden Kulturen hin. Trotz der signifikant erhöhten Zellausbeute nach Isolation in DMEM (5,11 Mio./g Knorpelgewebe), war diese nach Isolation in MINI (3,76 Mio./g Knorpelgewebe) nicht enttäuschend, sondern entsprach weitestgehend den Literaturangaben. Dabei wurden durch Isolation humaner Chondrozyten pro Gramm Gewebe Zellzahlen von 2,46 Mio. [61] bis 3,78 Mio. [108] erzielt. Insofern stellte die Isolation im Standardmedium DMEM eine sehr effektive Methode zur Gewinnung einer hohen Zellausbeute dar.

Die Isolation im nährstoffarmen Medium MINI hatte Reduktion der Zellausbeute sowie der Proliferationsrate in der anschließenden 2D-Kultivierung zur Folge. Trotzdem konnte eine zufrieden stellende Zellzahl direkt nach Isolation erreicht werden.

In der nachgeschalteten 2D-Kultivierung konnte nach DMEM-Isolation die gewünschte Proliferation mit einer Proliferationsrate von 2,73 erreicht werden, während durch Kultivierung nach MINI-Isolation nur eine geringe Proliferationsrate (1,28) festgestellt wurde. Somit wiesen die 2D-Kulturen nach DMEM-Isolation eine signifikant höhere Zellzahl als nach MINI-Isolation auf. Die durch Isolation in DMEM und anschließender 2D-Kultivierung erzielte Proliferation stimmte mit ermittelten Proliferationsraten anderer Arbeitsgruppen überein.

Beispielsweise konnte die Arbeitsgruppe um Tallheden *et al.* in der 2D-Kultivierung humaner Chondrozyten durchschnittlich 0,2 Zellverdopplungen pro Tag [95] und somit eine Proliferationsrate von 2 nach 10-tägiger Kultur beobachten.

Die 3D-Kultivierungen beider Isolationsvarianten wiesen keine erhöhten, aber vergleichbare Zellzahlen auf. Eine fehlende Proliferation während der Chondrozytenkultivierung in einem Kollagen-I-Gel konnte bereits durch Wakitani *et al.* gezeigt werden [113]. Seinen Vermutungen zu Folge wurde die Zellproliferation der von ihm verwendeten Kaninchen-Chondrozyten aufgrund einer Nährstofflimitierung in der 3D-Matrix unterdrückt. Weiterhin lässt sich vermuten, dass die umgebende Matrix die Proliferation der Chondrozyten begrenzt [72].

Einen Unsicherheitsfaktor in der Beurteilung der ermittelten Zellzahlen stellt die Möglichkeit von Zellverlusten durch wiederholtes Waschen der Zellpellets sowie durch den Verdau der 3D-Kultur dar.

Morphologische Untersuchungen der Zellen zeigten sowohl nach Isolation als auch nach 2D- oder 3D-Kultivierung keine Unterschiede in beiden Isolationsbedingungen.

Während die frisch isolierten Chondrozyten eine runde Form aufwiesen, hatte die 2D- und 3D-Kultur die Ausprägung einer fibroblasten-ähnlichen Morphologie zur Folge, welche die Dedifferenzierung dieser Chondrozyten kennzeichnet. Diese Beobachtungen konnten durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden, welche sowohl in der Monolayerkultur (2D) als auch in der Kultur im Kollagen-I-Gel (3D) die Ausbildung dieser Morphologie beschrieben [60, 72].

Bei der Betrachtung der Genexpression konnte im Vergleich zu NK eine Erhöhung der Kol I-Expression sowie eine Reduktion der Kol II-Expression durch die enzymatische Chondrozytenisolation in DMEM und in MINI verzeichnet werden. Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Hayman *et al.*, welche einen Isolationseinfluss auf das Genexpressionsmuster der Chondrozyten beschrieben [63]. Deren Untersuchungen zeigten, dass die Chondrozytenisolierung mit einer Reduktion der Kol II-Expression einher geht. Da der Verlust an Kol II ein Zeichen der Dedifferenzierung darstellt, ergeben sich dadurch Probleme für die anschließende Kultivierung [65, 114].

Zur Untersuchung der Dedifferenzierung wurde in dieser Arbeit das Verhältnis der Kol II/I-Expression der Chondrozyten ermittelt. Verglichen zu NK wiesen die isolierten als auch die kultivierten Chondrozyten eine Reduktionen in der Kol II/I-Expression auf. Zudem konnte, im Vergleich zu den Isolationen, nach der 2D- und 3D-Kultivierung eine stärkere Reduktion der Kol II/I-Expression und somit eine höhere Dedifferenzierung der Chondrozyten festgestellt werden.

Diese Ergebnisse spiegelten die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen über den Einfluss von Kulturbedingungen auf das Genexpressionsmuster wider. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine 2D-Kultivierung eine Änderung in der Kollagensynthese bewirkt, wobei hauptsächlich Kol I, der Marker für Dedifferenzierung, synthetisiert wird [60]. In einer 3D-Kultivierung konnte eine 100-fach erhöhte Kol I-Expression zur Kol II-Expression ermittelt werden [72].

Die 2D-Kultivierung von in MINI isolierten Zellen hatte ein signifikant höheres Kol II/I-Verhältnis (3-fach) zur Folge. Dieses Ergebnis lässt auf eine geringere Dedifferenzierung der Chondrozyten durch die nährstoffarme Isolation schließen. Auch nach der 3D-Kultivierung konnte die nährstoffarme Isolation in MINI die Dedifferenzierung der Chondrozyten reduzieren.

Nach der Betrachtung des Dedifferenzierungsstatus auf mRNA-Ebene wurde der Hypertrophiestatus der Chondrozyten untersucht. Als Produkt hypertropher Chondrozyten konnte das Kol X identifiziert werden, das durch Bindung von Kalzium zur Kalzifizierung des Knorpelgewebes und somit zu dessen Verknöcherung beiträgt [16, 17]. Um Aussagen über eine mögliche Hypertrophie der Chondrozyten treffen zu können, wurde deshalb deren Kol X-Expression ermittelt.

Dabei waren keine Unterschiede durch die verschiedenen Verdaubedingungen und anschließende Kultivierungen zu verzeichnen. Die erhöhte Kol X-Expression nach DMEM-Isolation ergab sich durch eine größere Streuung der Daten. Die Kol X-Expressionen waren in Bezug auf die GAPDH im Allgemeinen nur gering erhöht und lieferten keine Hinweise auf eine mögliche Hypertrophie der Chondrozyten.

Auf Proteinebene wurde für weitere Aussagen bezüglich der Hypertrophie bzw. Mineralisierung die AP-Aktivität bestimmt. Die AP, ein Glykoprotein, trägt durch die Hydrolyse phosphorylierter Metabolite zur Mineralisierung von Chondrozyten bei [45]. Die in dieser Arbeit bestimmte AP-Aktivität, wies im Vergleich zu den Isolationen, auf eine Erhöhung nach der Chondrozytenkultivierung hin. Sowohl nach Isolation als auch nach der 2D- oder 3D-Kultivierung konnte die nährstoffarme Isolation in MINI die AP-Aktivität positiv beeinflussen und dadurch reduzieren.

Des Weiteren wurde der Einfluss der nährstoffarmen Isolation analysiert, indem die MMP-3-Expression, als Beispielmarker für katabole Stoffwechselvorgänge, untersucht wurde. Dabei wiesen die Zellen der Chondrozytenisolation eine starke Erhöhung der MMP-3-Genexpression auf. Der enzymatische Abbau der EZM im Rahmen der Chondrozytenisolation führt zu einer Anreicherung von Kollagenfragmenten. Diese

können die Freisetzung von MMPs induzieren, die am EZM-Abbau beteiligt sind [46, 115]. Dieser Sachverhalt erklärt die erhöhte MMP-3-Genexpression durch die Isolation. Die reduzierte MMP-3-Expression in den nachgeschalteten 2D-Kulturen deutet auf eine nur geringe katabole Stoffwechselaktivität hin. Hingegen waren in den 3D-Kulturen kaum MMP-3-Expressionen zu verzeichnen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die nährstoffarme Isolation durch eine Reduktion der Dedifferenzierung positiv auf die Chondrozyten, besonders nach anschließender 2D-Kultivierung, auswirkt.

Zur Untersuchung eines möglichen EZM-Aufbaus während der Chondrozytenkultivierung wurde der Gehalt von Proteoglykanen als wichtige Matrixbestandteile des Knorpelgewebes bestimmt. Dabei konnte keinerlei Einfluss der nährstoffarmen Isolation in MINI sowohl nach 2D-Kultivierung als auch nach 3D-Kultivierung auf den Proteoglykangehalt der Kulturen beobachtet werden. Somit scheint die Isolation in MINI keinen Einfluss auf den Proteoglykangehalt der anschließenden Kulturen auszuüben. Zur Klärung dieser Aussage wären jedoch weitere Kultivierungen und Untersuchungen nötig.

Weiterhin zeigte die Bestimmung des Proteoglykangehaltes nach der 3D-Kultivierung geringere Werte als nach der 2D-Kultivierung.

Die niedrigen Genexpressionen und der geringe Proteoglykangehalt könnten im Kollagen-I-Gel auf fehlende oder nur sehr geringe anabole Stoffwechselaktivitäten deuten. Allerdings wies die niedrige MMP-3-Expression auch auf eine sehr geringe katabole Stoffwechselaktivität hin. Daraus lässt sich spekulieren, dass die Chondrozyten durch das Einbringen in diese 3D-Matrix mehr oder weniger "ruhig gestellt" wurden. Jedoch bedarf es weiterer Experimente mit verschiedenen Kultivierungszeiten, um diese Annahme untermauern zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Änderung von Isolationsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf das Genexpressionprofil und somit auf das Verhalten humaner Chondrozyten nach Isolation, aber auch nach anschließender Kultivierung hat. In der vorliegenden Arbeit gelang es, durch eine nährstoffarme Chondrozytenisolation und anschließender Kultivierung, die Genexpression knorpelspezifischer Marker und die AP-Aktivität arthrotischer Chondrozyten zu beeinflussen. Dabei konnte vor allem nach einer 2D-Kultivierung der Chondrozyten die Dedifferenzierung sowie deren AP-Aktivität, als Hypertrophiemarker, reduziert werden.

Als Nachteil der nährstoffarmen Isolation muss eine geringere Zellausbeute bzw. Proliferationsrate konstatiert werden. Dies könnte auf eine Selektion der Zellen hindeuten. Mit einer Optimierung des Zellstoffwechsels scheint aber eine Reduktion der Zellausbeute unumgänglich. Die Wichtigkeit einer hohen Zellausbeute ist, hinsichtlich einer geplanten Knorpeldefektfüllung, unumstritten. Dennoch spielt gerade bei Arbeiten mit arthrotischen Chondrozyten deren Zellstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Vielleicht sind in Sachen Zellausbeuten Abstriche zu Gunsten der Qualität der Chondrozyten nötig oder es sollten zukünftig Möglichkeiten zur Berücksichtigung beider Aspekte geschaffen werden.

Trotz dieser Problematik zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass eine Chondrozytenisolation unter nährstoffarmen Bedingungen zur Optimierung des Zellstoffwechsels arthrotischer Chondrozyten beiträgt und diese eine gute Alternative zu den üblichen Zellisolationsverfahren darstellen könnte.

4.4.1 Regulationsuntersuchungen nach 5-tägiger 2D-Kultivierung

Da der Einsatz einer nährstoffarmen Chondrozytenisolation in MINI bei anschließender 2D-Kultivierung zu einem weniger dedifferenzierten Phänotyp der Chondrozyten führte, ergab sich die Frage nach den dafür verantwortlichen Mechanismen bzw. möglichen Regulationen. Um Hinweise darauf zu erlangen, wurde das Genexpressionsprofil eines RNA-Pools von 6 Patienten nach 5-tägiger Kultivierung von in DMEM oder MINI isolierten Chondrozyten mit Hilfe eines Affymetrix-Genchips ermittelt. Durch die Wahl einer 5-tägigen Kultivierungsdauer wurden Adhärenz der Zellen sowie bereits wirkende Expansionseinflüsse erwartet.

Zur Analyse der Affymetrix-Chip-Daten wurden die Präsenz sowie Unterschiede der Genexpressionen beider Proben (MINI-2D/DMEM-2D) betrachtet und vor allem knorpelspezifische Gene wie Kollagene, Proteoglykane und MMPs untersucht.

Dabei konnte die Expression von 28 Kollagenen, 11 Proteoglykanen und 7 MMPs in beiden Proben nachgewiesen werden. Um den Einfluss der nährstoffarmen Isolation abzuschätzen, wurden die Expressionen beider Proben miteinander verglichen. Die Vielzahl der teilweise nur wenig reduzierten oder erhöhten Genexpressionen erschwerte Rückschlüsse auf mögliche Unterschiede im Stoffwechsel der Chondrozyten unter Einfluss einer nährstoffarmen Isolation. Allerdings konnten die knorpelspezifischen Genexpressionen in beiden Proben nachgewiesen und als Hinweis für weitere Untersuchungen genutzt werden.

Die Analyse der Ergebnisse zeigte in MINI-2D meist geringere Kollagen-Expressionen als in DMEM-2D. Hingegen sind die Expressionen einiger Proteoglykane, die auf Proteinebene wichtige Bestandteile der EZM darstellen, in MINI-2D geringfügig erhöht. Die ermittelte Expression der Kollagene und Proteoglykan lässt jedoch keine Schlussfolgerungen auf das EZM-Gerüst zu. Dazu wären weitere Untersuchungen auf Proteinebene nötig. Allerdings lässt deren Expressionsnachweis einen EZM-Aufbau in beiden Kulturen vermuten.

Auffällig war die 3-fache Erhöhung der Glypikan 3-Expression in MINI-2D, verglichen zu DMEM-2D. Die Expression von Glypikanen konnte vor allem während der Entwicklung beobachtet werden und scheint in die Regulation der Morphogenese involviert zu sein [24-26]. Aufgrund dieser Beobachtungen ließ sich durch die erhöhte Glypikan 3-Expression eine mögliche Regulation der in MINI isolierten Chondrozyten vermuten. Die Prüfung des Einflusses der nährstoffarmen Isolation auf die Glypikan-Expression und -Synthese bedarf allerdings weiterer Experimente mit unterschiedlichen Kultivierungszeiten, statistischer Absicherung der Ergebnisse sowie dem direkten Proteoglykannachweis.

Weiterhin zeigte sich in MINI-2D eine geringe Erhöhung der MMP-3-, -13- und -14-Expression, wogegen die MMP-2-Expression 2-fach geringer, verglichen zu DMEM-2D, war. MMP-2 kann sowohl Kollagene als auch andere Bestandteile der EZM wie Proteoglykane spalten [116].

MMP-Expressionen während einer Monolayerkultur wurden bereits mehrfach untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass vor allem eine hohe Expression kataboler Mediatoren wie MMP-2 auf eine nur geringe chondrogene Kapazität der Chondrozyten hinweisen [117, 118]. DMEM-2D wies, laut der Affimetrix-Chip-Analyse, aufgrund der erhöhten MMP-2 Expression eine insgesamt höhere MMP-Expression als MINI-2D auf. Dem zu Folge lässt sich vermuten, dass MINI-2D durch eine höhere chondrogene Kapazität charakterisiert war. Diese Vermutung sollte jedoch durch eine nachgeschaltete qRT-PCR der ermittelten MMP-Expressionen sowie durch einen Aktivitätsnachweis der MMPs bestätigt werden. In weiteren Experimenten wäre zudem eine Untersuchung von MMP-Inhibitoren, den TIMPs, sinnvoll, um detaillierte Aussagen über den Stoffwechsel treffen zu können.

Die bisherigen Affymetrix-Chip-Daten lassen vermuten, dass die kultivierten Chondrozyten durch eine nährstoffarmen Isolation einen verlangsamten

Zellstoffwechsel aufwiesen und dadurch möglicherweise eine Dedifferenzierung verzögern bzw. vermindern konnten.

Die durch die Affymetrix-Chip-Analyse ermittelten Ergebnisse konnten aufgrund einer Einzelbestimmung nicht statistisch abgesichert werden. Zudem handelte es sich um die Proben eines RNA-Pools.

Zur Prüfung dieser erhobenen Daten und zum Vergleich zur Genexpression nach vorangegangener 10-tägigen 2D-Kultivierung wurde die Genexpression der Marker Kol I, -II, -X und MMP-3 der einzelnen Patienten mittels qRT-PCR untersucht. Dabei war in 5-tägiger MINI-2D eine zum Teil nur geringe Reduktion aller Genexpressionen zu verzeichnen. Die Kol II/I-Expression war geringfügig erhöht und wies somit auf mRNA-Ebene auf eine geringere Dedifferenzierung hin. Allerdings konnten nach 5-tägiger Kultivierung keine signifikanten Unterschiede in den ermittelten Genexpressionen der Chondrozyten beider Kulturen (DMEM-2D, MINI-2D) festgestellt werden.

Somit ließ sich bereits nach 5-tägiger Kultivierung eine geringere Dedifferenzierung erzielen, welche nach 10-tägiger Kultivierung als signifikant aufgezeigt werden konnte (siehe Abb. 10). Hierbei könnten weitere Experimente mit längeren Kultivierungszeiten von Interesse sein, um einen möglichen zeitlichen Trend zu untersuchen und diesen vielleicht auf Proteinebene zeigen zu können.

Die Betrachtung der qRT-PCR lässt Zweifel an einigen Daten der Affymetrix-Chip-Analyse aufkommen. Zwar konnte die Reduktion der Kol I- und -II-Expression in MINI-2D bestätigt werden, doch zeigte sich in der qRT-PCR statt der Erhöhung eine Reduktion der MMP-3-Expression. Dieser Sachverhalt macht die Notwendigkeit einer Datenprüfung deutlich. Die Verwendung eines RNA-Pools könnte Ergebnisse verfälschen, weshalb diese in den einzelnen Patienten überprüft werden sollte. Zudem können Messfehler während der Analyse nicht ausgeschlossen werden, weshalb eine Durchführung mehrerer Chip-Analysen sowie deren statistische Absicherung unbedingt empfehlenswert erscheint.

Um auf Proteinebene Aussagen über Kol I und -II treffen zu können, wurden deren Expressionen durch die Anwendung immunhistochemischer Färbungen der 5-tägigen Kulturen (DMEM-2D, MINI-2D) detektiert. Auch auf Proteinebene bestätigte sich, dass

die nährstoffarme Isolation zu einer geringeren Kol I-Expression führt, wobei keine Unterschiede in der Kol II-Proteinexpression festgestellt werden konnten.

Grundsätzlich ist die quantitative Auswertung histologischer Methoden problembehaftet. So könnte beispielsweise die geringere Zellzahl in MINI-2D den Eindruck einer geringeren Kol I-Proteinfärbung begünstigt haben. Letztlich diene diese Methode vorrangig einem direkten Proteinnachweis. Auch bei diesem Sachverhalt muss angemerkt werden, dass weitere Experimente sowie verschiedene Kulturzeiten Aufschlüsse über die Proteinexpression im Laufe einer Kultivierung liefern könnten.

Zur weiteren Untersuchung regulatorischer Mechanismen sollte die Betrachtung angeschalteter Signalwege in den Kulturen dienen.

Durch die ermittelten Genexpressionen des Affymetrix-Chips konnte unter Zuhilfenahme der Kyoto Enzyklopädie der Gene und Genome ([www. genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) eine mögliche Involvierung des MAPK-Weges vermutet werden.

Sowohl die aus dieser Arbeit resultierenden Daten als auch zahlreiche Literaturangaben [74, 119, 120] gaben Anlass eine Beteiligung der MAPK-Kaskade zu untersuchen.

Die Auswertung der Affymetrix-Chip-Analyse ermöglichte hierbei den Nachweis von 22, der MAPK-Kaskade zugehörigen, Genen. Im Vergleich zu DMEM-2D in MINI-2D wurden 5 geringere und 17 leicht erhöhte mRNA-Expressionen ermittelt.

Um Hinweise über die Beteiligung der drei MAPK-Hauptwege zu erlangen, wurden die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 betrachtet. In MINI-2D konnte eine erhöhte ERK-Expression festgestellt werden, hingegen wies DMEM-2D eine erhöhte p38- und JNK-Expression auf.

Zum Nachweis auf Proteinebene wurden diese MAP-Kinasen sowohl in DMEM-2D als auch in MINI-2D nach 5-tägiger Kultivierung untersucht. Zur Bestimmung aktivierter MAP-Kinasen wurden deren phosphorylierte Formen detektiert.

Die Western Blot-Analyse ermöglichte den Nachweis der ERK-, p38- und JNK-Kinase in beiden Kulturen. Die Chondrozytenkultur nach nährstoffarme Isolation hatte eine geringere Aktivierung bzw. Beteiligung der ERK-Kinase zur Folge als nach Standardisolation in DMEM.

Der ERK-Weg übt eine Kontrollfunktion in Prozessen wie Proliferation, Transformation und Differenzierung aus [121], wobei die resultierende Regulation einer ERK-Aktivierung in Chondrozyten ein viel diskutiertes Thema in der Literatur darstellt.

Hauptsächlich fanden hierzu Untersuchungen während der Chondrogenese statt. Durch den Nachweis einer Hochregulierung bzw. Aktivierung von c-Raf, die eine Aktivierung von ERK bewirkt, wurde auf eine ERK-Beteiligung während der chondrozytären Differenzierung *in vivo* [122] geschlossen. Zudem konnte dem c-Raf/MEK1/2-ERK1/2-Weg eine Rolle in der hypertrophen Differenzierung zugeordnet werden [123].

Dem gegenüber wiesen weitere Untersuchungen auf eine repressive Rolle von ERK auf die Transdifferenzierung vom Chondrozyt zum Osteoblast und somit auf die Hypertrophie hin. Die zum Teil gegensätzlichen Erkenntnisse in Bezug auf die ERK-Kinase zeigten, dass ERK abhängig von verschiedenen Bedingungen eine Chondrozytendifferenzierung stimulieren als auch inhibieren kann und dass ERK-Proteine verschiedene Rollen in verschiedenen Phasen der Chondrozytendifferenzierung übernehmen können [119].

Weiterhin wird dem ERK-Weg eine wichtige Funktion bei inflammatorischen Prozessen im Gelenk zugesprochen [124]. Beispielsweise konnte, in *in vitro*-Experimenten, durch die Inhibierung der IL-1 β -induzierten Stimulation von MMPs auch eine Aktivierung des ERK-Weges reduziert werden [125]. Dieser Sachverhalt lässt auf eine ERK-Beteiligung in entzündlichen Prozessen im Rahmen degenerativer Gelenkerkrankungen schließen.

Die in dieser Arbeit detektierte geringere Aktivierung der ERK-Kinase durch die nährstoffarme Isolation lässt somit die Vermutung auf eine Reduktion proinflammatorischer Mediatoren in der Kultur zu.

Die weitere Untersuchung der p38- und JNK-Aktivierung zeigte, dass MINI-2D eine geringere Aktivierung der p38-Kinase aufwies als DMEM-2D, wogegen in beiden Kulturen keine Aktivierung bzw. Beteiligung der JNK-Kinase nachgewiesen werden konnte.

In vielen funktionellen Untersuchungen der p38- und JNK-Kinase konnte deren Aktivierung durch IL-1 oder TNF beobachtet werden. Daraus ergab sich die Vermutung, dass diese beiden Kinasen an Vorgängen, die zur Knorpeldegeneration führen, beteiligt sind [120]. Weiterhin konnte eine Aktivierung der p38 in arthrotisch veränderten und in mechanisch beanspruchtem Knorpelgewebe detektiert werden [126-128], welche in die durch IL-1 induzierte Inhibierung der Kollagen-Synthese und Induktion von Kollagenasen involviert ist [77, 129]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird die Inhibierung der p38- und JNK-Kinase als Möglichkeit zur Knorpelerhaltung und -regeneration angesehen [120, 130]. Durch weitere Untersuchungen konnte der

p38-Kinase eine unterstützende Rolle in der Transdifferenzierung vom Chondrozyt zum Osteoblast zugeordnet werden [119].

Aufgrund dieser beschriebenen Funktionen lässt der geringe repressive Einfluss der nährstoffarmen Isolation auf die ERK- und p38-Aktivierung eine Verbesserung in Richtung chondrozytären Phänotyp vermuten. Zur Unterstützung dieser Hypothese bedarf es weiterführender Experimente, um die beteiligten Signalwege detailliert analysieren zu können. Die Analyse verschiedener Kultivierungszeiten könnte Aufschluss über einen eventuellen zeitlichen Trend in der Aktivierung von Signalwegen und Beeinflussung der Kulturen durch eine nährstoffarme Isolation geben.

Die durch Signalwege wie den MAPK-Weg übertragenen externen Signale können auf Transkriptionsfaktoren oder Proteine übertragen werden und somit einen Einfluss auf die Transkription und letztlich das Verhalten der Zellen ausüben [73].

Beispielsweise konnten Zhou *et al.* die Regulation der HDAC4 durch eine Ras-MAPK-Signalübertragung im Tiermodell nachweisen und identifizierte damit die HDACs als Strukturen einer Ras-MAPK-Signalübertragung [131].

Weiterhin erschienen die HDACs für diese Arbeit von großem Interesse, nachdem Huh *et al.* eine Regulierung der Kol II-Expression durch HDACs in artikulären Chondrozyten beobachten konnten [81].

Durch die Deacetylierung von Histonen spielen HDACs in der Regulation der Transkription eine entscheidende Rolle und können das Wachstum sowie die Differenzierung von verschiedenen Zelltypen beeinflussen [82, 83]. Die HDAC-Funktionen sind dabei noch weitestgehend unklar [81]. Zur Untersuchung ihrer spezifischen Funktionen dienen Gendelektions-Experimente, welche beispielsweise der HDAC1 eine wichtige Rolle in der Knorpelentwicklung des Zebrafisches zuordnen konnten [89]. Des Weiteren gelang der Nachweis, dass die HDAC4 und 5 wichtige Repressoren der Chondrozytenhypertrophie sind [88, 132, 133].

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A die IL-1- und TNF- α -induzierte Synthese von knorpeldestruktiven MMPs, Prostaglandin E2 und NO blockieren und die Proteoglykan-Degradation supprimieren [134, 135]. Im Gegensatz dazu beobachteten Huh *et al.* eine Blockierung der Synthese des Kol II, als Schlüsselmolekül der Knorpelmatrix, durch die Inhibierung von HDACs in Chondrozyten und stellten somit den Einsatz von HDAC-Inhibitoren zur Unterdrückung der Knorpeldegeneration in Frage [81].

Um mögliche regulatorische Funktionen der HDACs in den zu untersuchenden Kulturen abschätzen zu können, wurden deren Expressionen auf mRNA-Ebene sowie deren Aktivität auf Proteinebene ermittelt. Dabei dienten die Affymetrix-Chip-Daten zur Untersuchung der HDAC-Expressionen nach der 5-tägigen Kultivierung von in DMEM oder MINI isolierten Zellen. Sowohl in DMEM-2D als auch in MINI-2D gelang die Detektion der Klasse I zugehörigen HDAC1, -2, -3 und -8 sowie der Klasse II zugehörigen HDAC 4, -6 und -9.

Untersuchungen der HDACs zeigten, dass HDAC1 und -2 eng miteinander verwandt sind und an der Bildung eines Korepressor-Komplexes beteiligt sind. HDAC3 kann ebenfalls an Korepressoren binden und aktiviert werden. HDAC1/2/3 enthaltende Komplexe dienen als Korepressoren zahlreicher Transkriptionsrepressoren und sind beispielsweise an der Regulation von Runx2, einem Transkriptionsfaktor für zelluläre Hypertrophie, beteiligt [136-138]. HDAC8-Expressionen konnten in der glatten Muskulatur detektiert werden, wo sie zur Muskelkontraktion beitragen [86].

Im Gegensatz zu HDACs der Klasse I, sind die Klasse II HDACs durch eine gewebsspezifische Expression und durch einen stimulationsabhängigen nukleozytoplasmatischen Transport charakterisiert [139]. Im Knorpelgewebe werden ihnen hauptsächlich Rollen in der Repression der zellulären Hypertrophie zugesprochen [88].

Die Affymetrix-Chip-Analyse wies auf eine geringfügige Erhöhung der HDAC-Expressionen in MINI-2D hin. Zur Prüfung dieser Daten wurden die HDAC-Expressionen anschließend in den einzelnen Patienten durch eine qRT-PCR quantifiziert. Diese Analyse wies auf eine signifikante Erhöhung der HDAC2- (2,3-fach) und -6-Expression (2,1-fach) durch eine nährstoffarme Isolation, nach anschließender 5-tägige Kultivierung, hin.

Die Recherche möglicher HDAC2-Funktionen im Knorpel gestaltete sich durch fehlende Untersuchungen schwierig. Bisher konnte gezeigt werden, dass HDAC1 und -2 Korepressor-Komplexe wie mSin3A bilden können. Die beobachtete Interaktion dieses Komplexes mit Runx2 ließ auf eine Repression der zellulären Hypertrophie schließen [138, 140, 141].

Die HDAC6 ist vor allem in den späten Stadien der Differenzierung hoch exprimiert und kann durch Interaktion mit Runx2 ebenfalls die zelluläre Hypertrophie reprimieren [138].

Diese Erkenntnisse lassen, in Bezug auf die in diesen Experimenten erhöhten HDAC2- und -6-Expressionen, eine Repression der zellulären Hypertrophie in MINI-2D vermuten. Zur Absicherung dieser Vermutung müssten in weiteren Experimenten Protein- und Aktivitätsnachweise der HDAC2 und -6 erfolgen.

In Anbetracht einer möglichen Repression der Hypertrophie in MINI-2D stellt sich die Frage, ob diese der Erhaltung oder aufgrund progressiver Mineralisierung der Rettung der Chondrozyten dienen sollte.

Letztlich konnte nach 10-tägiger Kultivierung der in MINI isolierten Zellen eine geringere AP-Aktivität bzw. Hypertrophie/Mineralisierung detektiert werden.

Zur Betrachtung der HDACs auf Proteinebene wurden diese immunhistochemisch nach der 5-tägigen Expansionskultur in DMEM-2D und MINI-2D nachgewiesen. Dabei konnte in beiden Kulturen die Proteinexpression aller untersuchten HDACs detektiert werden. Um die Aktivität der HDAC6 beurteilen zu können, wurde dessen phosphorylierte Form markiert.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte zum Teil Unterschiede in der Lokalisation der detektierten HDACs. Die Färbungen der HDAC3, -4, -6, phospho-6 und -8 konnten als eine nukleusumhüllende Struktur erkannt werden. Hingegen zeigte sich, dass die HDAC2 hauptsächlich im Nukleus vorkommt. Die HDAC1 konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert werden.

Bisher wurden die HDACs der Klasse I als nukleär lokalisiert beschrieben, während die HDACs der Klasse II zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma pendeln können [139]. Die Beobachtungen in dieser Arbeit konnten dies nicht bestätigen, da die meisten HDAC-Färbungen den Nukleus umhüllten und teilweise im Bereich des Nukleus Aussparungen zu erkennen waren. Ob diese Erscheinung mit der Kultivierung arthrotischer Chondrozyten einhergeht, müsste in nachfolgenden Experimenten und der Lokalisationsbestimmung im Knorpelgewebe untersucht werden.

Die Intensitäten der HDAC1, -3, -4, phospho-6 und -8 waren in beiden Kulturen vergleichbar. Hingegen war die HDAC2- und -6-Färbung in DMEM-2D etwas intensiver als in MINI-2D. Inwieweit dies auf eine höhere Proteinexpression in DMEM-2D hinweist, müsste durch eine Bestimmung der Proteinmenge geklärt werden. Denkbar wäre allerdings, dass durch die geringere Zellzahl in MINI-2D die Färbung weniger intensiv wirkte. Unter Berücksichtigung der geringeren Zellzahl in MINI-2D

ließ die Detektion der phosphorylierten bzw. aktivierten Form von HDAC6 schließlich in beiden Kulturen auf eine vergleichbare Aktivität schließen.

Bei Betrachtung der Proteinebene konnte im Gegensatz zur mRNA-Expression keine erhöhte HDAC2- und -6-Expression in MINI-2D aufgezeigt werden. Möglicherweise könnte dies aber zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung eintreten, weshalb weitere Kultivierungen in einem zeitlichen Verlauf untersucht werden sollten.

Nach der Prüfung der mRNA- und Proteinexpression der HDACs erfolgte die Bestimmung derer Aktivität unter Verwendung eines HDAC-Aktivitätsassays. Die Regulation der HDAC-Aktivität wird als sehr komplex beschrieben. Neben der Modulation der HDAC-Funktion durch Protein-Protein-Interaktionen in verschiedenen Korepressorkomplexen wird die HDAC-Aktivität zusätzlich noch durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung/Dephosphorylierung und Sumoylierung reguliert [142]. Die Phosphorylierung der Klasse II HDACs reguliert darüber hinaus deren subzelluläre Lokalisation und die daraus resultierende enzymatische Aktivität [143, 144].

Um die Rolle von HDACs bei der Erhaltung des differenzierten chondrozytären Phänotyps zu untersuchen, bestimmten Huh *et al.* in Kaninchen-Chondrozyten deren Aktivitäten während der Dedifferenzierung in Monolayerkultur und Redifferenzierung in Zellpelletkultur [81]. Während der Dedifferenzierung konnte die bereits beschriebene Reduktion der Kol II-Expression [60], aber auch eine Reduktion in der HDAC-Aktivität aufgezeigt werden. Die Redifferenzierung in der 3D-Kultur hatte eine Erhöhung beider zur Folge. Diese Beobachtungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen der HDAC-Aktivität und dem chondrozytären Differenzierungsstatus hin.

Weiterhin konnte durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren eine Hochregulierung der Expression von Wnt-5a erzielt werden, was zu einer Inhibierung der Kol II-Expression führte. Dem zu Folge begünstigen HDACs die Kol II-Expression durch eine Suppression der Wnt-5a-Transkription [81].

Durch die Bestimmung der HDAC-Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten Kulturen konnte durch die nährstoffarme Isolation eine geringere Aktivität festgestellt werden. Da unter Verwendung des HDAC-Aktivitätsassays nur die Gesamtktivität der HDACs ermittelt wurde, konnten keine Aussagen über die Beteiligung der speziellen HDACs getroffen werden.

Laut den Beobachtungen von Huh *et al.*, würde die geringere HDAC-Aktivität in MINI-2D auf eine stärkere Dedifferenzierung hinweisen. Allerdings waren die Unterschiede in der HDAC-Aktivität von DMEM-2D und MINI-2D nicht signifikant und Dedifferenzierungsprozesse in beiden Expansionskulturen präsent.

Letztlich erzielte die Isolation in einem nährstoffarmen Medium nach 10-tägiger 2D-Kultivierung einen weniger dedifferenzierten chondrozytären Phänotyp.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die nährstoffarme Chondrozytenisolation zu einer geringeren Aktivierung der MAP-Kinasen ERK und p38 in den Kulturen führte. Weiterhin hatte die nährstoffarme Isolation einen Einfluss auf die HDAC-Expression und führte zu einer erhöhten HDAC2- und -6-Expression.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die Signalübertragung durch die MAPK-Kaskade und die Veränderung in der HDAC-Expression nach nährstoffarmer Isolation zusammenhängen. Zudem ist unklar, ob bzw. wie die erhöhten HDAC2- und -6-Expressionen in MINI-2D zur Verbesserung des Phänotyps nach 10-tägiger Kultur beigetragen haben. Die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der aktivierten MAPK-Kaskade und erhöhten HDAC-Expressionen sowie deren Funktionen erfordert weitere Experimente sowie Protein- und Aktivitätsnachweise. Daraus gewonnene detaillierte Erkenntnisse könnten zum besseren Verständnis und zur Behandlung degenerativer Knorpelerkrankungen beitragen.

4.5 HDAC-Profil im Knorpelgewebe

In Anbetracht der vorangegangenen Ergebnisse aus den Zellkulturen rückte die Erstellung eines HDAC-Profiles in Knorpelgeweben ins Interesse. Diese Profilerstellung erfolgte sowohl in Normal- als auch in OA-Knorpelgeweben. Der Vergleich beider Profile ermöglichte Veränderungen im HDAC-Profil durch die Pathomechanismen der Arthrose festzustellen.

In beiden Knorpelgeweben gelang die Detektion von 10 der 11 untersuchten HDAC-Expressionen, wobei keine HDAC10-Expression ermittelt werden konnte.

Untersuchungen zu Folge ist die HDAC10-Expression in Tumorzellen reduziert, weshalb diese einen potenziellen Prognoseindikator in Krebserkrankungen darstellt. Da es sich bei der HDAC10 um die zuletzt identifizierte und charakterisierte HDAC

handelt, bedarf es weiterer Erforschung, um Aufschlüsse über deren Regulation und Funktion zu erhalten [84, 145].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die HDAC10 nicht im adulten humanen Knorpelgewebe exprimiert ist. Diese Aussage wird durch eine fehlende HDAC10-Expression in humanen Chondrozyten bestätigt (siehe Affymetrix-Chip-Analyse).

In den beiden ermittelten HDAC-Profilen konnten verglichen zu allen HDAC-Expressionen hohe HDAC1- und -3-Expressionen festgestellt werden. Diese konnten im OA-Knorpelgewebe, verglichen zum Normalknorpelgewebe, sogar als signifikant erhöht (1,7- bzw. 2,9-fach) identifiziert werden. Zudem wies das OA-Knorpelgewebe eine signifikant erhöhte HDAC8-Expression (3-fach) auf.

Die Funktion der HDAC1 in Knorpelgeweben ist in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Während der embryonalen Entwicklung des Zebrafisches konnte die Notwendigkeit der HDAC1 für die Bildung des kraniofazialen Knorpels aufgezeigt werden [89]. Weiterhin hatte die Interaktion der HDAC1 mit dem Wachstumsfaktor LRF (Leukemia/Lymphoma-Related Factor) eine Inhibierung der COMP-Expression und Chondrozytendifferenzierung zur Folge [90]. Diese Beobachtungen lassen auf einen regulativen Einfluss der HDAC1 auf die Chondrozytendifferenzierung schließen.

Wie die in dieser Arbeit ermittelte signifikant erhöhte HDAC1-Expression in OA-Knorpelgeweben zu werten ist, bleibt unklar. Zur Klärung möglicher Funktionen der HDAC1 in humanem Knorpelgewebe sind weitere und detaillierte Experimente notwendig.

Der HDAC3, die hauptsächlich während der Osteoblasten-Differenzierung exprimiert wird, werden Funktionen in der Knochenbildung zugesprochen. Durch die Repression der Runx2-vermittelten Transkription wichtiger Osteoblastengene ist die HDAC3 in der Lage, die Knochenbildung zu supprimieren [137].

In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit würde eine erhöhte HDAC3-Expression im OA-Knorpelgewebe auf eine zunehmende Osteoblasten-Differenzierung bzw. Hypertrophie hinweisen, welche durch die Anschaltung der HDAC3-Expression inhibiert wird. Dieses Ergebnis weist auf eine zunehmende Hypertrophie in arthrotisch verändertem Knorpelgewebe hin.

Jedoch lassen auch die relativ hohen HDAC3-Expressionen in den Normalknorpelgeweben eine sich entwickelnde Hypertrophie der Chondrozyten vermuten. Dies würde bedeuten, dass die als normal und klinisch unauffällig

bezeichneten Knorpelgewebe nicht als völlig gesund angesehen werden können, da auch diese vermutlich bereits pathogenen Veränderungen unterlagen. Allerdings stellten diese Proben das einzige Material dar, welches am ehesten als Normalknorpel eingeordnet werden konnte und zum Vergleich zu OA-Knorpelgewebe diente. Eine weitere Erklärung für die erhöhten HDAC3-Expressionen könnte eine unsachgemäße Gewinnung der Knorpelproben durch eine zusätzliche Verwendung von Knochengewebe sein.

Eine Expression der HDAC8 in humanen Knorpelgeweben wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Untersuchungen zu Folge wird die HDAC8 in der glatten Muskulatur exprimiert, wo sie Funktionen in der Muskelkontraktion übernimmt [86]. Weiterhin wurde ihr eine Rolle in der Tumorgenese zugeordnet [146].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Expression der HDAC8 in humanem Knorpelgewebe detektiert werden, wobei in OA-Knorpelgeweben eine erhöhte HDAC8-Expression nachweisbar war. Die Funktion der HDAC8 im Knorpelgewebe bzw. während einer Arthroseausbildung bleibt ungeklärt. Diese könnte möglicherweise durch Protein- und Aktivitätsnachweise charakterisiert werden.

Bei der Erstellung des HDAC-Profiles in Normalknorpelgewebe konnte in nur 3 von 5 Patienten eine HDAC7-Expression detektiert werden. Zudem gelang in 3 von 5 Osteoarthrose-Patienten der Nachweis der HDAC4- und -7-Expression.

Weiterhin konnte in keinem der Knorpelgewebe eine HDAC10-Expression ermittelt werden. Zur Prüfung dieser Ergebnisse wurde eine zusätzliche PCR für die Amplifikation der HDAC4-, -7- und -10-mRNA durchgeführt.

Im Normalknorpelgewebe gelang in 9 von 10 Patienten der Nachweis einer HDAC4-Expression, während im OA-Knorpelgewebe nur 3 von 10 Patienten eine HDAC4-Expression aufwiesen. Hierbei stellt sich die Frage, warum in OA-Knorpelgeweben häufig keine HDAC4-Expressionen zu verzeichnen sind. Die beschriebene HDAC4-Funktion als Repressor der Hypertrophie [88] lässt vermuten, dass nicht in allen arthrotischen Knorpelgeweben der progressiven Hypertrophie entgegengewirkt wird oder diese bereits spätere Stadien der Arthroseerkrankung erreicht hatten.

Die Überprüfung der HDAC7-Primer wies im Normalknorpelgewebe zum Teil nur sehr schwache und im OA-Knorpelgewebe teilweise keine Expressionen auf. Dieses

Ergebnis zeigt die Nachweisgrenze dieser Expressionen mittels herkömmlicher PCR auf und bestätigt somit die, durch qRT-PCR ermittelten, schwachen Expressionen der HDAC7. Daraus lässt sich schließen, dass die HDAC7, ein Repressor der Osteoblasten-Entwicklung [147], keinen bedeutenden regulatorischen Einfluss auf die untersuchten Knorpelgewebe hatte. Diese Schlussfolgerung wird durch die fehlende HDAC7-Expression in den untersuchten Chondrozyten bekräftigt (siehe Affymetrix-Chip-Daten).

Die HDAC10-PCR erbrachte in keinem der Knorpelgewebe den Nachweis einer HDAC10-Expression, wodurch die vorangegangenen Daten der qRT-PCR bestätigt wurden.

Zur Prüfung der HDAC7- und -10-Primer wurden diese unter Verwendung von primären Tubulusepithelzellen in einer PCR getestet. Durch diese Positivkontrolle konnte die Funktionalität dieser Primer bewiesen werden.

Die gewonnenen Ergebnisse über die HDAC-Profile in den untersuchten Knorpelgeweben lässt auf eine Beteiligung der HDACs am Knorpelstoffwechsel schließen. Die in OA-Knorpelgeweben erhöhten HDAC1-, -3- und -8-Expressionen weisen auf eine Regulation bzw. Funktion in der Arthroseausbildung hin.

Weiterhin könnte die Aufklärung der HDAC-Funktionen im Knorpelgewebe und dessen degenerativen Erkrankungen hilfreich zur Entwicklung von neuen Therapieansätzen sein.

4.6 RNA-Qualität

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Genexpressionsdaten sind unter Betrachtung der RNA-Qualität der Proben zu bewerten.

Die Qualitätskontrolle in dieser Arbeit erfolgte stichprobenartig unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits. Während die, zur Genexpressionsanalyse notwendige, RNA-Isolation aus Chondrozyten nach Isolation sowie der 2D- und 3D-Kultivierung eine gute RNA-Qualität erzielte, war die Qualität der RNA aus Knorpelgewebe nicht grundsätzlich zufrieden stellend (Daten nicht gezeigt).

In der Literatur wird die RNA-Isolierung aus Chondrozyten als technisch unproblematisch angesehen und eingesetzt [60, 69, 118, 148]. Weitaus schwieriger

erscheint jedoch die RNA-Isolation aus Knorpelgewebe, da diese aufgrund des geringen Zell- und des hohen Proteoglykangehaltes des Knorpels problembehaftet ist [149, 150]. Demzufolge sind hierbei mit Einbußen bezüglich der RNA-Qualität und somit auch in der Analyse der Genexpression zu rechnen. Das bedeutet, dass alle ermittelten Genexpressionsdaten aus Knorpelgeweben durchaus kritisch zu betrachten sind. Zur Absicherung dieser wären weitere Experimente mit einer hohen Probenanzahl nötig.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zur Behandlung von Knorpeldefekten im Rahmen der ACT bedarf es aufgrund chondrozytärer Dedifferenzierungsvorgänge, Techniken zur *in vitro*-Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps. Während die Veränderungen im Zellverhalten in der Chondrozytenkultur vergleichsweise gut untersucht sind, wurden die Auswirkungen der Isolationsbedingungen auf den Phänotyp der Chondrozyten bislang nur wenig beachtet.

In der vorliegenden Dissertation konnte jedoch die Relevanz der Chondrozytenisolation auf die Veränderung des Phänotyps der Chondrozyten nachgewiesen werden. Durch die Anpassung des Isolationsmediums an die nährstoffarme *in vivo*-Situation im Knorpelgewebe ist es erstmals gelungen die ungünstige Dedifferenzierung kultivierter Chondrozyten zu verringern. Damit konnte diese Arbeit die Chondrozytenisolation als eine wichtige Phase zur Regulation der Dedifferenzierung kultivierter Chondrozyten identifizieren.

Diese Dissertation trägt deshalb zu einem besseren Verständnis der molekularen Vorgänge während der Chondrozytenisolation und -kultivierung bei. Sie eröffnet neue Ansätze zur Förderung einer *in vitro*-Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps und leistet einen wichtigen Beitrag zur Behandlung von Knorpeldefekten. Die Untersuchungen zum Isolationseinfluss auf das Verhalten arthrotisch vorgeschädigter Chondrozyten könnten neue Ansatzpunkte für eine zukünftige therapeutische Intervention degenerativer Knorpelerkrankungen bieten.

5. Literaturverzeichnis

1. Hunziker, E.B., *Articular Cartilage Structure in Humans and Experimental Animals*. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, R.S. K. Kuettner, J.G. Peyron, and V.C. Hascall, Editor. 1992, Raven Press: New York. p. 183-199.
2. Roth, V. and V.C. Mow, *The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age*. J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(7): p. 1102-17.
3. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 487-504.
4. Bullough, P. and J. Goodfellow, *The significance of the fine structure of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Br, 1968. **50**(4): p. 852-7.
5. Mollenhauer J., K.K.E., *Articular Cartilage*, in *Principles of Orthopaedic Practice*, H.L. Dee R, Gruber M, Kottmeier S, Editor. 1997, McGraw-Hill: New York. p. 85-94.
6. Heinegard D., L.P., Saxne T., *Matrix Glycoproteins, Proteoglycans, and Cartilage*, in *Ruddy S, Harris ED, Jr., Sledge CB*. 2001, Kelly's Textbook of Rheumatology. p. 41-50.
7. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 477-86.
8. Stockwell, R.A., *Biology of cartilage cells*. I, ed. e. R.J. Harrison and R.M.H. McMin. 1979, Cambridge: Cambridge University Press. 32-80.
9. Poole, C.A., *The Chondrocyte and Its Pericellular Microenvironment*, in *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, R.S. K. Kuettner, J.G. Peyron, and V.C. Hascall, Editor. 1992, Raven Press: New York. p. 183-199.
10. Mollenhauer J., A.M., *Grundlegendes zum Gelenkknorpel*, in *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*, E.W. Fritz J, Eichhorn H-J, Editor. 2003, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: Aufl. Berlin Heidelberg. p. 3-8.
11. Horton, W., *Morphology of Connective Tissue: Cartilage*. Wiley-Liss Inc., 1993.
12. Kuettner, K.E., *Biochemistry of articular cartilage in health and disease*. Clin Biochem, 1992. **25**(3): p. 155-63.
13. von der Mark, K., et al., *Anchorin CII, a type II collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **460**: p. 214-23.
14. Poole, C.A., S. Ayad, and R.T. Gilbert, *Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 4): p. 1101-10.
15. Eyre, D.R., *Collagens and cartilage matrix homeostasis*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S118-22.
16. Kielty, C.M., et al., *Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes*. Biochem J, 1985. **227**(2): p. 545-54.
17. Kirsch, T. and K. von der Mark, *Ca²⁺ binding properties of type X collagen*. FEBS Lett, 1991. **294**(1-2): p. 149-52.
18. Miosge, N., et al., *Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(3): p. 229-36.
19. Hardingham, T.E. and A.J. Fosang, *Proteoglycans: many forms and many functions*. Faseb J, 1992. **6**(3): p. 861-70.
20. Doege, K.J., et al., *Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific*

- repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem*, 1991. **266**(2): p. 894-902.
21. Sandy, J.D. and A.H. Plaas, *Studies on the hyaluronate binding properties of newly synthesized proteoglycans purified from articular chondrocyte cultures*. *Arch Biochem Biophys*, 1989. **271**(2): p. 300-14.
 22. Lee, C.R., et al., *A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat*. *Eur Spine J*, 2007. **16**(12): p. 2174-85.
 23. Veugelers, M., et al., *Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(38): p. 26968-77.
 24. Li, M., et al., *Expression of OCI-5/glypican 3 during intestinal morphogenesis: regulation by cell shape in intestinal epithelial cells*. *Exp Cell Res*, 1997. **235**(1): p. 3-12.
 25. Saunders, S., S. Paine-Saunders, and A.D. Lander, *Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain*. *Dev Biol*, 1997. **190**(1): p. 78-93.
 26. Litwack, E.D., et al., *Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent*. *Dev Dyn*, 1998. **211**(1): p. 72-87.
 27. Schwartz, N.B. and M. Domowicz, *Chondrodysplasias due to proteoglycan defects*. *Glycobiology*, 2002. **12**(4): p. 57R-68R.
 28. Mali, M., et al., *Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(12): p. 6884-9.
 29. Morgelin, M., et al., *Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(9): p. 6137-41.
 30. Rosenberg, K., et al., *Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(32): p. 20397-403.
 31. Radin E.L., S.S.R., *Biomechanics of Joints*, in *Kelly's Textbook of Rheumatology*, H.E. Ruddy S, Jr., Sledge CB, Editor. 2001, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 73-78.
 32. Otte, P., *Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies*. *Z Rheumatol*, 1991. **50**(5): p. 304-12.
 33. Fassbender, H.G., *Pathomechanismen der Osteoarthrose*. *Akt. Rheumatol.*, 1984. **9**: p. 91-98.
 34. Arden, N. and M.C. Nevitt, *Osteoarthritis: epidemiology*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. **20**(1): p. 3-25.
 35. Boecker W., D.H., Heitz P.H., *Pathologie [Pathology]*. 2004, Urban & Fischer: Muenchen. p. 1069-1070.
 36. Harris, E.D.J., *The bone and joint decade: a catalyst for progress*. *Arthritis and Rheumatism*, 2001. **44**: p. 1969-1970.
 37. Felson, D.T., *Risk factors for osteoarthritis: understanding joint vulnerability*. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(427 Suppl): p. S16-21.
 38. Loeser, R.F., Jr., *Aging cartilage and osteoarthritis--what's the link?* *Sci Aging Knowledge Environ*, 2004. **2004**(29): p. pe31.
 39. Messner, K. and W. Maletius, *The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes*. *Acta Orthop Scand*, 1996. **67**(2): p. 165-8.
 40. König A., K.S., *Langzeitergebnisse in der Knieendoprothetik*. *Orthopäde*, 2003. **32**: p. 516-526.

41. Dean, D.D., et al., *Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage*. J Clin Invest, 1989. **84**(2): p. 678-85.
42. Matyas, J.R., et al., *Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(3): p. 420-5.
43. Aigner, T., K. Gluckert, and K. von der Mark, *Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions*. Osteoarthritis Cartilage, 1997. **5**(3): p. 183-9.
44. Aigner, T., et al., *Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 829-37.
45. Kirsch, T., et al., *Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes*. J Cell Biol, 1997. **137**(5): p. 1149-60.
46. Struglics, A., et al., *Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(2): p. 101-13.
47. Wilhelm, S.M., et al., *Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21906-13.
48. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2387-92.
49. Davidson, R.K., et al., *Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. R124.
50. Gelber, A.C., et al., *Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis*. Ann Intern Med, 2000. **133**(5): p. 321-8.
51. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.
52. Peterson, L., et al., *Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability*. Am J Sports Med, 2002. **30**(1): p. 2-12.
53. Peterson, L., et al., *Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 17-24.
54. Peterson, L., et al., *Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee*. Clin Orthop Relat Res, 2000(374): p. 212-34.
55. Roberts, S., et al., *Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(11): p. 2586-98.
56. Fritz, J., et al., *[Significance and technique of autologous chondrocyte transplantation]*. Zentralbl Chir, 2005. **130**(4): p. 327-32.
57. Dell'Accio, F., C. De Bari, and F.P. Luyten, *Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(7): p. 1608-19.
58. Aigner, T. and J. Dudhia, *Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(5): p. 287-91.
59. Martin, J.A. and J.A. Buckwalter, *The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 106-10.

60. Schnabel M, M.S., Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V et al, *Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2002(10): p. 62-70.
61. Jakob, M., et al., *Enzymatic digestion of adult human articular cartilage yields a small fraction of the total available cells*. Connect Tissue Res, 2003. **44**(3-4): p. 173-80.
62. Hidvegi, N.C., et al., *A low temperature method of isolating normal human articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(1): p. 89-93.
63. Hayman, D.M., et al., *The effects of isolation on chondrocyte gene expression*. Tissue Eng, 2006. **12**(9): p. 2573-81.
64. Loeser, R.F., *Chondrocyte integrin expression and function*. Biorheology, 2000. **37**(1-2): p. 109-16.
65. Benya PD, S.J., *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. Cell., 1982 Aug. **30**((1)): p. 215-24.
66. Binette F, M.D., Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R., *Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro*. J Orthop Res., 1998 Mar. **16**((2)): p. 207-16.
67. Barbero, A., et al., *Expansion on specific substrates regulates the phenotype and differentiation capacity of human articular chondrocytes*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1140-9.
68. Davies, L.C., et al., *The Potential of IGF-1 and TGFbeta1 for Promoting "Adult" Articular Cartilage Repair: An In Vitro Study*. Tissue Eng Part A, 2008.
69. Chubinskaya, S., et al., *Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(10): p. 1211-20.
70. Grigolo, B., et al., *Down regulation of degenerative cartilage molecules in chondrocytes grown on a hyaluronan-based scaffold*. Biomaterials, 2005. **26**(28): p. 5668-76.
71. Gaissmaier C., F.J., Benz K., Stoop R., Schewe B., Weise K., *Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte*. SFA-Arthroskopie Aktuell, 2003. **16**: p. 4-14.
72. Gavenis, K., Schmidt-Rohlfing, B., Mueller-Rath, R., Andereya, S., Schneider, U., *In Vitro comparison of six different matrix for the cultivation of human chondrocytes*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal, 2006. **42**: p. 159-167.
73. Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 4th ed, ed. W.-V.V.G.C. KGaA. 2008, Weinheim.
74. Ciarmatori, S., et al., *Signaling mechanisms leading to regulation of proliferation and differentiation of the mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18 in response to IGF-I*. J Mol Endocrinol, 2007. **38**(4): p. 493-508.
75. Ding, G.J., et al., *Characterization and quantitation of NF-kappaB nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28897-905.
76. Martel-Pelletier, J., et al., *Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK)*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(11): p. 2399-409.

77. Mengshol, J.A., et al., *Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(4): p. 801-11.
78. Liacini, A., et al., *Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes*. Exp Cell Res, 2003. **288**(1): p. 208-17.
79. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
80. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 786-94.
81. Huh, Y.H., J.H. Ryu, and J.S. Chun, *Regulation of type II collagen expression by histone deacetylase in articular chondrocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 17123-31.
82. Wade, P.A., *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 693-8.
83. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson, *Control of muscle development by dueling HATs and HDACs*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 497-504.
84. Yang, X.J. and S. Gregoire, *Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 2873-84.
85. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src*. Oncogene, 2006. **25**(32): p. 4495-500.
86. Waltregny, D., et al., *Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility*. Faseb J, 2005. **19**(8): p. 966-8.
87. Zhang, C.L., et al., *Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy*. Cell, 2002. **110**(4): p. 479-88.
88. Vega, R.B., et al., *Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis*. Cell, 2004. **119**(4): p. 555-66.
89. Pillai, R., et al., *Histone deacetylase 1 (HDAC-1) required for the normal formation of craniofacial cartilage and pectoral fins of the zebrafish*. Dev Dyn, 2004. **231**(3): p. 647-54.
90. Liu, C.J., et al., *Leukemia/lymphoma-related factor, a POZ domain-containing transcriptional repressor, interacts with histone deacetylase-1 and inhibits cartilage oligomeric matrix protein gene expression and chondrogenesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47081-91.
91. Kim, T.Y., Y.J. Bang, and K.D. Robertson, *Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy*. Epigenetics, 2006. **1**(1): p. 14-23.
92. Gallinari, P., et al., *HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics*. Cell Res, 2007. **17**(3): p. 195-211.
93. Neuwirth, J., et al., *Expression of bioactive bone morphogenetic proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. R92.
94. Chandrasekhar, S., M.A. Esterman, and H.A. Hoffman, *Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride*. Anal Biochem, 1987. **161**(1): p. 103-8.

95. Tallheden, T., et al., *Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(3): p. R560-8.
96. Andereya, S., et al., *[Treatment of patellofemoral cartilage defects utilizing a 3D collagen gel: two-year clinical results]*. Z Orthop Unfall, 2007. **145**(2): p. 139-45.
97. Sato, T., et al., *Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(3): p. 808-17.
98. Pritzker, K.P., et al., *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(1): p. 13-29.
99. Klusmann, A., et al., *Individual and occupational risk factors for knee osteoarthritis - study protocol of a case control study*. BMC Musculoskelet Disord, 2008. **9**: p. 26.
100. Egli, R.J., et al., *Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes*. J Orthop Res, 2008. **26**(7): p. 977-85.
101. Watt, F.M., *Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture*. J Cell Sci, 1988. **89** (Pt 3): p. 373-8.
102. Sittering, M., et al., *Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture*. Biomaterials, 1994. **15**(6): p. 451-6.
103. Grimmer, C., et al., *Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels*. Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 491-502.
104. Friedman, E.A., et al., *Reduction in hyperlipidemia in hemodialysis patients treated with charcoal and oxidized starch (oxystarch)*. Am J Clin Nutr, 1978. **31**(10): p. 1903-14.
105. Blitek, A., et al., *Effect of steroids on basal and LH-stimulated prostaglandins F(2alpha) and E(2) release and cyclooxygenase-2 expression in cultured porcine endometrial stromal cells*. Reprod Biol, 2007. **7**(1): p. 73-88.
106. Wright, N. and A. Bhamjee, *Gentamicin extraction from an anuric patient by combined haemodialysis and charcoal haemoperfusion*. Postgrad Med J, 1980. **56**(652): p. 140-1.
107. Gruber R., S.M., Bujia J., *Analysis of the In Vitro Engineering of Human Chondrocytes with Autologous Human Serum. Minimization of the Possible Risk of Infection with Germs of Prion Disease*. 1996, Laryngo-Rhino-Otol.: New York. p. 105-108.
108. Munirah, S., et al., *Autologous versus pooled human serum for articular chondrocyte growth*. J Orthop Surg (Hong Kong), 2008. **16**(2): p. 220-9.
109. Chua, K.H., et al., *Basic fibroblast growth factor with human serum supplementation: enhancement of human chondrocyte proliferation and promotion of cartilage regeneration*. Singapore Med J, 2007. **48**(4): p. 324-32.
110. Badrul, A.H., et al., *The effects of autologous human serum on the growth of tissue engineered human articular cartilage*. Med J Malaysia, 2004. **59 Suppl B**: p. 11-2.
111. Samsudin, O.C., et al., *In vitro development of autologous tissue engineered human articular neocartilage for orthopaedic surgery*. Med J Malaysia, 2004. **59 Suppl B**: p. 15-6.
112. Azmi, B., et al., *The significance of using pooled human serum in human articular cartilage tissue engineering*. Med J Malaysia, 2004. **59 Suppl B**: p. 13-4.

113. Wakitani, S., et al., *Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel*. J Bone Joint Surg Br, 1989. **71**(1): p. 74-80.
114. Benya, P.D., S.R. Padilla, and M.E. Nimni, *Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture*. Cell, 1978. **15**(4): p. 1313-21.
115. Jennings, L., et al., *The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes*. Connect Tissue Res, 2001. **42**(1): p. 71-86.
116. Aimes, R.T. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5872-6.
117. Milner, J.M., et al., *Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage reveals pro-collagenase activation as a critical step for collagenolysis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(5): p. R142.
118. Grogan, S.P., et al., *Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(2): p. 586-95.
119. Stanton, L.A., T.M. Underhill, and F. Beier, *MAP kinases in chondrocyte differentiation*. Dev Biol, 2003. **263**(2): p. 165-75.
120. Geng, Y., J. Valbracht, and M. Lotz, *Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2425-30.
121. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
122. Kaneko, Y., H. Tanzawa, and K. Sato, *The proto-oncogene C-raf-1 is highly expressed only in the hypertrophic zone of the growth plate*. Calcif Tissue Int, 1994. **54**(5): p. 426-30.
123. Beier, F., A.C. Taylor, and P. LuValle, *Raf signaling stimulates and represses the human collagen X promoter through distinguishable elements*. J Cell Biochem, 1999. **72**(4): p. 549-57.
124. Saklatvala, J., *Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappaB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(2): p. 305-13.
125. Legendre, F., et al., *Rhein, a diacerhein-derived metabolite, modulates the expression of matrix degrading enzymes and the cell proliferation of articular chondrocytes by inhibiting ERK and JNK-AP-1 dependent pathways*. Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(4): p. 546-55.
126. Schett, G., et al., *Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2501-12.
127. van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg, *Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2000. **3**(3): p. 205-11.

128. Honda, K., et al., *The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(9): p. 601-9.
129. Badger, A.M., et al., *SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 467-73.
130. Studer, R.K., et al., *Chondrocyte response to growth factors is modulated by p38 mitogen-activated protein kinase inhibition*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(1): p. R56-R64.
131. Zhou, X., et al., *Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14329-33.
132. Hug, B., *HDAC4: a corepressor controlling bone development*. Cell, 2004. **119**: p. 448-449.
133. Kang JS, A.T., Delston R, Derynck R, *Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3*. Embo J, 2005. **24**: p. 2543-2555.
134. Young, D.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(3): p. R503-12.
135. Chabane, N., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in human chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(10): p. 1267-74.
136. Yang, X.J. and E. Seto, *Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(2): p. 143-53.
137. Schroeder, T.M., et al., *Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41998-2007.
138. Westendorf, J.J., et al., *Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7982-92.
139. Verdin, E., F. Dequiedt, and H.G. Kasler, *Class II histone deacetylases: versatile regulators*. Trends Genet, 2003. **19**(5): p. 286-93.
140. Laherty, C.D., et al., *Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression*. Cell, 1997. **89**(3): p. 349-56.
141. Lutterbach, B., et al., *A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 651-6.
142. Sengupta, N. and E. Seto, *Regulation of histone deacetylase activities*. J Cell Biochem, 2004. **93**(1): p. 57-67.
143. Pflum, M.K., et al., *Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47733-41.
144. Cai, R., et al., *Mammalian histone deacetylase 1 protein is posttranslationally modified by phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(2): p. 445-53.
145. Osada, H., et al., *Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients*. Int J Cancer, 2004. **112**(1): p. 26-32.

146. Lee, H., et al., *Histone deacetylase 8 safeguards the human ever-shorter telomeres 1B (hEST1B) protein from ubiquitin-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(14): p. 5259-69.
147. Jensen, E.D., et al., *Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(3): p. 361-72.
148. Castagnola, P., et al., *Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro*. J Cell Biol, 1988. **106**(2): p. 461-7.
149. Kuettner, K.E., et al., *Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology*. J Cell Biol, 1982. **93**(3): p. 743-50.
150. Watanabe, H. and K. Kimata, *[The roles of proteoglycans for cartilage]*. Clin Calcium, 2006. **16**(6): p. 1029-33.

6 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller Universität Jena in der Zeit von November 2005 bis November 2008 angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt zunächst Herrn PD. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Jürgen Mollenhauer für die Überlassung des Themas sowie seine stetige Hilfe und fachliche Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Rolf Bräuer möchte ich mich besonders für die motivierende Betreuung und menschliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rudolf A. Venbrocks, Prof. Dr. Raimund W. Kinne und PD Dr. Pullig danke ich für die Bereitstellung des Forschungslabors am Waldkrankenhaus "Rudolf Elle" zur Durchführung meiner praktischen Arbeiten sowie für das Interesse an meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Carsten Voigt für die fachliche Hilfe und bei Herrn Hardi Hauk für die Bereitstellung von OP-Aufnahmen bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Forschungslabors am Waldkrankenhaus "Rudolf Elle" für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt:

- Frau Dr. Anke Rüttger für unzählige Hilfen und Unterstützungen in jeder Hinsicht
- Herrn Alexander Brodhun für seine Hilfsbereitschaft und die freundliche Einführung in die Methoden
- Frau Jana Schömburg für das allzeit offene Ohr und Hilfe in allen Laborfragen
- Frau Sarah Kirsch für ihre stetige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung histologischer Präparate

Anke, Sarah, Jana I, Jana II, Andrea, Alex, Franzi, Bianca, Dirk, David und René danke ich für die freundschaftliche Aufnahme und Unterstützung in allen Bereichen. Dank euch kann ich auf eine schöne Zeit zurückblicken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir in jeder Lebenslage den Rücken stärkt und mir bedingungslose Unterstützung bietet.

7 Erklärungen

7.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne Inanspruchnahme unerlaubter fremder Hilfe erstellt habe. Ich habe nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen zur Anfertigung dieser Arbeit eingesetzt und alle Materialien und Dienstleistungen, die ich von Dritten erhalten habe, als solche gekennzeichnet.

Jena, den 17.03.2009

Steffi Neumann

7.2 Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o. g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 17.03.2009

Steffi Neumann

8 Lebenslauf

Dipl. Biol. Steffi Neumann

geboren am 18.03.1982

in Weimar, ledig

Schulausbildung:

1988 - 1992	Grundschule Mellingen
1992 - 2000	Staatliches Gymnasium Buttstedt-Mellingen in Mellingen, Abschluss Abitur

Studium:

10/2000 - 09/2005	Diplomstudiengang: Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2004 - 09/2005	Diplomarbeit " <i>In vivo</i> -Charakterisierung der Funktion des 3A-Proteins von Cocksackievirus B3" am Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2005	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologin

Beruflicher Werdegang:

11/2005 - 05/2008	Forschungsabteilung am Waldkrankenhauses "Rudolf Elle" GmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena wissenschaftliche Mitarbeiterin, Doktorandin
06/2008 - 11/2008	Graduiertenstipendium der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Weiterbildung:

02/2008	Sicherheitsaspekte der Gentechnik Fortbildungsveranstaltung nach §15 Absatz 4 Satz 2 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit (Fernlehrgang); Hamburg Akademie
---------	---

Publikationsliste:

Veröffentlichungen in Zeitschriften

Wessels E., Duijsings D., Niu TK., Neumann S., Oorschot V.M., de Lange F., Lanke K.H., Klumperman J., Henke A., Jackson C.L., Melchers W.J., van Kuppeveld F.J. (2006). A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Dev Cell*. 11,191-201.

Voigt C.*, Neumann S.*, Brodhun A., Mollenhauer J., Pullig O. Low concentration of hyaluronic acid stabilizes the chondrocytic phenotype during chondrocyte isolation. (in Bearbeitung).

(* Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei)

Neumann S., Voigt C., Brodhun A., Mollenhauer J., Eger W., Pullig O. Isolation of chondrocytes for autologous chondrocyte transplantation under reduced glucose stabilizes the chondrogenic phenotype. (in Bearbeitung)

Ruettger A.*, Neumann S.*, Huber R., Wiederanders B. RNA isolation from cartilage: pitfalls and general guidelines. (in Bearbeitung)

(* Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei)

Konferenzbeiträge

Neumann S., Voigt C., Brodhun A., Pullig O., Optimierung des chondrozytären Phänotyps für die ACT (Autologe Chondrozytentransplantation), Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2007, Berlin, Posterpräsentation und Postervortrag

Neumann S., Voigt C., Brodhun A., Pullig O., Isolation of chondrocytes for autologous chondrocyte transplantation under reduced nutrients stabilizes the chondrogenic phenotype, Annual meeting of the Orthopaedic Research Society 2008, San Francisco, Posterpräsentation

Voigt C., Neumann S., Brodhun A., Mollenhauer J., Pullig O., Low concentration of hyaluronic acid stabilizes the chondrocytic phenotype during chondrocyte isolation, Annual meeting of the Orthopaedic Research Society 2008, San Francisco, Vortrag

Jena, den 17.03.2009

Steffi Neumann